

**Synthese von maßgeschneiderten thiolierten
Raman-Farbstoffen für den Einsatz in der
oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Svetlana Brem

aus Slawgorod (Russland)

Essen, August 2017

Gutachter:

Prof. Dr. Sebastian Schlücker

Prof. Dr. Carsten Schmuck

Tag der mündlichen Prüfung 28.11.17

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2013 bis März 2017 im Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. Sebastian Schlücker angefertigt.

Hiermit bestätige ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit den angegebenen Quellen erstellt zu haben.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, 8. Dezember 2017, Svetlana Brem

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich dem Professor Doktor Sebastian Schlücker aussprechen, der mir die wunderbare Gelegenheit für die Anfertigung der Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis gegeben hat. Bedanken möchte ich mich für seine wissenschaftliche Unterstützung, großes Interesse am Erfolg meiner Dissertation und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenso möchte ich dem Herrn Professor Doktor Carsten Schmuck für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Ganz herzlich danke ich der Werdelmann-Stiftung für die finanzielle Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Vom ganzen Herzen danke ich Florian Selbach für die lustigen Arbeitstage, seine Unterstützung und zahlreiche wissenschaftlichen Diskussionen und für die Erstellung und die freundliche Erlaubnis für die Verwendung der Abbildung 3.2. Dem Matthias König danke ich für seine zahlreichen Hilfen im Mikroskopielabor und für die lustigen Kaffeepausen. Außerdem danke ich Florian Selbach, Matthias König und Banafshe Zakeri für die nette und unterhaltsame Zeit in unserem gemeinsamen Büro.

Ebenso danke ich Bernd Walkenfort für seine stete Hilfsbereitschaft und seine geduldige und fachkundige Einweisung in viele Gerätschaften, sowie für die zahlreichen TEM- und REM-Messungen. Ich danke ebenso dem Doktor Jörg Wissler für die netten wissenschaftlichen und privaten Gespräche.

Natürliche danke ich allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schlücker für die nette Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich meinen geliebten Eltern Natalia und Peter, denen ich diese Arbeit widmen möchte. Danke für die Geduld und die enorme Unterstützung in alldem was ich mache. Ohne Eure Liebe, Zuspruch und Vertrauen, würde ich niemals soweit kommen.

Meinem Verlobten Eduard möchte ich besonders für alles, was er für mich in dieser Zeit gemacht hat, danken.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
δ	chemische Verschiebung
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
AcS-2DB	Ethyl-(2E,4E)-5-(acetylthio)-penta-2,4-dienoat (29)
AcS-3DB	Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-(acetylthio)-hepta-2,4,6-trienoat (30)
AuNP	Gold-Nanopartikel
AuNP@Au-Film	Gold-Nanopartikelfilme auf einem Goldfilm
AuNP@Si-Substrat	Gold-Nanopartikel auf einem Silizium-Objekträger
AgNP	Silber-Nanopartikel
AuNS	Gold-Nanosterne
Äq	Äquivalent
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
^t BuS-2DB	Ethyl-(2E,4E)-5-(<i>tert</i> -butylthio)penta-2,4-dienoat (33)
^t BuS-3DB	Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(<i>tert</i> -butylthio))hepta-2,4,6-trienoat (34)
^t BuSPH-2DB	Ethyl-(2E,4E)-5-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)penta-2,4-dienoat (39)
^t BuSPH-3DB	Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trienoat (40)
^t BuSPH-4DB	Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoat (41)
^t BuSPH-5DB	Ethyl-(2E,4E,6E,8E,10E)-11-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)undeca-2,4,6,8,10-pentaenoat (42)
APTMS	Aminopropyltriethoxysilan
DC	Dünnschicht-Chromatografie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
EM-NP	Edelmetall-Nanopartikel
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Elektrospray Ionisation)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
g	Gramm

Abkürzung	Bezeichnung
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
IR	Infrarot
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MeCN	Acetonitril
M	molar
m/z	Masse pro Ladung
min	Minute(n)
MHz	Megahertz
MPLC	<i>medium performance liquid chromatography</i> (Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie)
MUTMAB	[(11-Mercaptoundecyl)-N,N,N-trimethylammonium bromide]
NA	<i>numerical aperture</i> (Numerische Apertur)
NIR	<i>near infrared</i> (Nahinfrarot)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
pH	potentia hydrogenii
ppm	<i>parts per million</i>
p.a.	pro analysi
RP18	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase), Octadecylkette
PVP	Polyvinylpyrrolidon
s	Sekunde(n)
SERS	<i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i> (Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie)
SERRS	<i>Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering</i> (Oberflächenverstärkte Resonanz Raman-Spektroskopie)
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> (Transmissionselektronenmikroskopie)
TERS	<i>Tip-Enhanced Raman Spectroscopy</i> (Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie)
TFA	Trifluoressigsäure
UV	<i>ultraviolet</i> (ultravioletter Spektralbereich)
Vis	<i>visible</i> (sichtbarer Spektralbereich)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	3
3 Theoretische Grundlagen	5
3.1 Grundlagen der optischen Spektroskopie	5
3.1.1 Absorption	5
3.1.2 Streuung	5
3.2 Raman-Effekt	6
3.3 Luminenszenz, Fluoreszenz und Phosphoreszenz	7
3.4 Extinktion	8
3.5 Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz	9
3.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung	9
3.6.1 Elektromagnetische Verstärkung	10
3.6.2 Chemische Verstärkung	11
3.6.3 SERS-Auswahlregeln	11
3.7 Oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Effekt (SERRS)	11
4 Stand der Forschung	13
4.1 Aufbau von SERS-Nanopartikeln	13
4.2 Einsatz von Xanthen-Farbstoffen in SERS/SERRS	14
4.3 Einsatz von Carotinoiden in SERS/SERRS	15
4.4 SERS-Substrate	16
5 Ergebnisse und Diskussion	17
5.1 Organisch-chemische Synthese und optisch-spektroskopisch Charakterisierung von neuen thiolierten Rhodaminen	17
5.1.1 Synthese des thiolierten Rhodamins 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1) durch Reduktion mit komplexen Hydriden	18
5.1.2 Synthese von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1) durch Triphenylphosphin/Iod Reduktion	19
5.1.3 Synthese von Rhodamin-Derivaten mit thiolierten Ethylen-Abstandshaltern	20
5.2 Raman-spektroskopische Untersuchung von adsorbierten aromatischen Thiolen und Aminen auf Metallkolloiden	22
5.3 Raman-spektroskopische Untersuchung der thiolierten Rhodamine	23

5.4	Charakterisierung von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1)	25
5.4.1	Computer-chemische Berechnungen	25
5.4.2	Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie	29
5.4.3	SERS-Experimente mit Gold-Nanosternen	30
5.4.4	SERS mit AuNP@Au-Film	33
5.4.5	SERS mit AuNP@Si	34
5.5	Zusammenfassung Rhodamin-Raman-Farbstoffe	38
5.6	Organisch-chemische Synthese und optische/spektroskopische Charakterisierung von thiolierten Polyenen	41
5.6.1	Synthesen der Acetyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (29) und (30)	41
5.6.2	Synthese der <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (33) und (34)	43
5.6.3	Synthese von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (39), (40), (41) und (42)	44
5.7	Absorption, Raman-Spektroskopie und SERS der monothiolierten vinylischen Polyene	46
5.7.1	Raman-spektroskopische Charakterisierung von Acetyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyenen (29) und (30)	46
5.7.2	Absorptionsspektren von monothiolierten vinylischen Polyenen (33) und (34)	48
5.7.3	Raman-spektroskopische Charakterisierung von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (33) und (34)	49
5.7.4	SERS von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyenen auf AuNP-Filmen	51
5.8	Absorption, Raman-Spektroskopie und SERS von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen	52
5.8.1	Raman-spektroskopische Charakterisierung von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (39), (40), (41) und (42)	52
5.8.2	Absorptionsspektren von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (39), (40), (41) und (42)	55
5.8.3	SERS von <i>tert</i> -Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (39), (40), (41) und (42)	57
5.9	Synthese von dithiolierten Polyenen	58
5.9.1	Synthese von Acetyl-geschützten dithiolierten vinylischen Polyenen	58
5.9.2	Synthese von <i>tert</i> -Butyl-geschützte dithiolierte vinylischen Polyenen	60
5.9.3	Synthese von dithiolierten phenylischen Polyenen mittels Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion	61
5.9.4	Dimer-Assemblierung	63
5.10	Zusammenfassung Polyen-Raman-Farbstoffe	65
6	Zusammenfassung und Ausblick	69
7	Summary and Outlook	71

8	Material und Methoden	73
8.1	Lösungsmittel und Chemikalien	73
8.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	75
8.3	Präparative Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)	75
8.4	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR)	75
8.5	UV-Vis-Absorptionsspektroskopie	75
8.6	Raman-Spektroskopie	76
8.7	Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	77
8.8	Dichtefunktionaltheorie	78
8.9	Synthesevorschriften	79
8.9.1	4-(3,6-diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure (1)	79
8.9.2	4-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (2)	80
8.9.3	2-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)-5-[(2-sulfanylethyl)carbamoyl]benzoesäure (3)	81
8.9.4	6-Amino-9(2-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)carbamoyl)phenyl)-4,5-dimercapto-3H-xanthen-3-iminium (4)	82
8.9.5	4-(3,6-Diamino-4,5-bis[(2-sulfanylethyl)sulfamoyl]-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (5)	83
8.9.6	4-(3,6-Diamino-4,5-disulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (6)	84
8.9.7	4-(3,6-Diamino-4-sulfonylchloride-5-sulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (7)	85
8.9.8	3-Iodo-2Z-propensäuremethylester (12a)	86
8.9.9	1,6-Dimethyl-2Z,4E-hexadiester (43a)	86
8.9.10	(2E,4E)-Diemthy-hexa-2,4-dienoat (43b)	87
8.9.11	Methyl(2E,4Z)-6-hydroxyhexa-2,4-dienoat (44)	88
8.9.12	Methyl(2E,4Z)-6-bromohexa-2,4-dienoat (45)	89
8.9.13	Methyl(2E,4Z)-6-(diethoxyphosphoryl)-hexa-2,4-dienoat (46)	90
8.9.14	((1E,3E)-5-Bromopenta-1,3-dien-1-yl)(<i>tert</i> -butyl)sulfan (58)	91
8.9.15	Diethyl-((2E,4E)-5-(<i>tert</i> -Butylthio)penta-2,4-dien-1-yl)-phosphonat (59)	91
8.9.16	S-(Hydroxymethyl)ethanthioat (20)	92
8.9.17	S-(Bromomethyl)ethanthioat (21)	92
8.9.18	S-((diethoxyphosphoryl)methyl)ethanthioat (22)	93
8.9.19	Methyl-(2E,4E)-5-methyl-6-oxohexa-2,4-dienoat (16)	93
8.9.20	Methy-(2E,4E,6E)-7-(acetylthio)-5-methylhepta-2,4,6-trienoat (24)	94
8.9.21	(Ethoxy-carbonylmethylene)-triphenylphosphoran (26)	95
8.9.22	Ethyl-(2E,4E)-5-(<i>tert</i> -butylthio)penta-2,4-dienoat (33)	96
8.9.23	4-(<i>tert</i> -Butylthio)benzaldehyd (36a)	97
8.9.24	4-(<i>tert</i> -Butylthio)benzalkohol (55)	98
8.9.25	4-(Bromomethyl)phenyl-(<i>tert</i> -butyl)sulfan (56)	99
8.9.26	Diethyl-(4-(<i>tert</i> -butylthio)benzyl)phosphonat (57)	100
8.9.27	Allgemeine Vorschrift für DIBAL-H-Reduktion	101
8.9.28	(Z)-3-Iodoprop-2-en-1-ol (25a)	101
8.9.29	(E)-3-(<i>tert</i> -Butylthio)prop-2-en-1-ol (32a)	102

Inhaltsverzeichnis

8.9.30 (2E,4Z)-5-iodopenta-2,4-dien-1-ol (25b)	102
8.9.31 (2E,4E)-5-(<i>tert</i> -Butylthio)penta-2,4-dien-1-ol (32b)	103
8.9.32 (E)-3-(4-(<i>tert</i> -Butylthio)phenyl)hepta-2,4-dien-1-ol (38a)	104
8.9.33 (2E,4E)-5-(4-(<i>tert</i> -Butylthio)phenyl)penta-2,4-dien-1-ol (38b)	104
8.9.34 (2E,4E,6E)-7-(4-(<i>tert</i> -Butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-ol (38c)	105
8.9.35 (2E,4E,6E,8E)-9-(4-(<i>tert</i> -Butylthiol)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol (38d)	105
8.9.36 (2E,4E)-Hexa-2,4-dien-1,6-diol (47)	106
8.9.37 Allgemeine Vorschrift für Oxidation mit MnO ₂ & Wittig Reaktion insitu	107
8.9.38 Ethyl-(2E,4Z)-5-iodopenta-2,4-dienoat (27b)	107
8.9.39 Ethyl-(2E,4E)-5-iodopenta-2,4-dienoat (27a)	108
8.9.40 Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-iodohepta-2,4,6-trienoat (28b)	109
8.9.41 Ethyl-(E)-3-(4-(<i>tert</i> -butylthiol)pentyl)acrylat (37)	109
8.9.42 Ethyl-(2E,4E)-5-(4- <i>tert</i> -butylthio)phenyl-penta-2,4-dienoat (39)	110
8.9.43 Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)-hepta-2,4,6-trienoat (40)	110
8.9.44 Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)-nona-2,4,6,8-tetraenoat (41)	111
8.9.45 Ethyl-(2E,4E,6E,8E,10E)-11-(4-(<i>tert</i> -butylthio)phenyl)-undeca-2,4,6,8, 10-pentaenoat (42)	112
8.9.46 Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(<i>tert</i> -butylthio))-hepta-2,4,6-trienoat (34)	113
8.9.47 Synthese des aktivierten Mangandioxid	114
8.9.48 (2E,4E)-Hexa-2,4-diendial (48)	114
8.9.49 (2E,4E)-5-(<i>tert</i> -Butylthio)penta-2,4-dienal (60)	115
8.9.50 (Z)-3-(<i>tert</i> -Butylthiol)acrylaldehyd (52)	115
8.9.51 Allgemeine Vorschrift für die Einführung des Thioacetats am sp ² -Kohlenstoff	116
8.9.52 Ethyl-(2E,4E)-5-(acetylthio)-penta-2,4-dienoat (29)	116
8.9.53 Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-(acetylthio)-hepta-2,4,6-trienoat (30)	116
8.9.54 (1E,3E,5E,7E)-1,8-Dibromoocta-1,3,5,7-tetraen (49)	117
8.9.55 (1E,3E,5E,7E)-1,8-Diodoocta-1,3,5,7-tetraen (50)	117
8.9.56 S,S-((1E,3E,5E,7E)-octa-1,3,5,7-tetraen-1,8-diyl)-diethanthioat (51)	118
8.9.57 <i>tert</i> -Butyl-(1E,3E)-4-iodobuta-1,3-dien-1-yl)sulfan (53)	119
8.9.58 (1E,3E)-1,4-bis(<i>tert</i> -Butylthio)buta-1,3-dien (54)	120
8.9.59 <i>tert</i> -Butyl(4-((1E,3E,5E)-6-(<i>tert</i> -butylthio)hexa-1,3,5-trien-1-yl)phenyl) sulfan (61)	121
8.9.60 (1E,3E,5E,7E)-1,8-bis(4-(<i>tert</i> -Butylthio)phenyl)octa-1,3,5,7-tetraen (62)	122
8.9.61 Dimer-Synthese	123
Abbildungsverzeichnis	124
Tabellenverzeichnis	129
Literaturverzeichnis	130

1 Einleitung

Die Geschichte der Fluoreszenzfarbstoffe beginnt im 16. Jahrhundert mit der Entdeckung eines blauen fluoreszenten Farbstoffes, der aus der Rinde eines mexikanischen Baumes extrahiert wurde.^[1] Die Wechselwirkung des Lichtes mit der Lösung dieses blauen Farbstoffes wurde von Kircher beschrieben.^[2] George Gabriel Stokes verwendete später ein Prisma zur spektralen Zerlegung des Sonnenlichtes und illuminierte damit eine Quinin-Lösung. Stokes konnte damit nachweisen, dass die Fluoreszenz langwelliger als das eingestrahlte Licht ist. Damit führte er den Begriff der Stokes Verschiebung ein. Stokes hatte als erster die Idee die Fluoreszenz als analytische Methode zu verwenden.^[3] Die ersten synthetischen Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluorescein und Mauve wurden bereits im 18. Jahrhundert hergestellt.^[4, 5] Etwas später wurden die Definitionen Fluorophor als Bezeichnung für fluoreszente Verbindungen und Chromophor als Bezeichnung für Farben eingeführt.^[6] Schließlich wurde das Fluoreszenzmikroskop^[7] entwickelt und zu ersten Untersuchungen der Autofluoreszenz von Bakterien und Bindung von Farbstoffen an Zellen eingesetzt. Der von Coons FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierter Antikörper war einer der ersten Erfolge in der Immunfluoreszenz.^[8] Derartig fluoreszenzmarkierte Antikörper werden in der Immunhistochemie für die selektive Detektion von Antigenen eingesetzt.^[9]

Ein zentrales Ziel der modernen Bioanalytik ist die schnelle und sensitive Erfassung von möglichst vielen Analyten (Multiplexing). Die Kapazität von Parallelnachweisen mit Fluoreszenzanalysemethoden ist durch die spektral breiten Fluoreszenzbanden auf vier bis sechs Farben begrenzt.^[10] Eine genaue Quantifizierung der Anzahl von Zielmolekülen (Proteine) ist ebenfalls nicht möglich. Raman-Farbstoffe bieten aufgrund der geringeren Linienbreite der Schwingungs-Raman-Banden eine höhere Multiplexing-Kapazität. Raman-Reportermoleküle sind trifunktionelle Raman-aktive Moleküle mit π -Systemen und mit Thiol- oder Aminogruppen für die Chemisorption an einer Metalloberfläche. Zudem besitzen diese funktionelle Gruppen (z.B. -COOH) für die weitere Biokonjugation. Zum Einsatz als Markierungsreagenz müssen die Farbstoffe auf die Oberfläche eines Edelmetallnanopartikels gebunden werden.^[11, 12]

Fluoreszenzfarbstoffe (Rhodamine, Cyanin-Farbstoffe) eignen sich ebenfalls für den Einsatz in der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS). Dabei spielt die Abstandsabhängigkeit der Raman-Reporter zur plasmonisch aktiven Oberfläche eine Rolle. SERS bietet die Möglichkeit der multiplen Detektion von mehreren Raman-Reportern (SERS-Marker) gleichzeitig. Anhand der SERS-Signalintensität können quantitative Aussagen getroffen werden.

Weitere Vorteile von SERS-Markern sind: Photostabilität, Anregung mit nur einer Wellenlänge, Minimierung von Autofluoreszenz in Bioproben (Zellen, Gewebe) bei Anregung im roten oder nah-infraroten Bereich.^[12, 13, 14, 15]

Diese Dissertation befasst sich mit der Synthese von neuen maßgeschneiderten Raman-Farbstoffen, die für die Herstellung von besonders hellen Raman-Markern eingesetzt werden können. Kapitel 3 dieser Arbeit behandelt die theoretischen Grundlagen der optischen Spektroskopie und

1 Einleitung

des Raman-Effektes. Kapitel 2 stellt die Aufgabenstellung und die Motivation zur Synthese und Verwendung der neuen Rhodamin- und Polyen-Derivate ausführlich dar. Die Ergebnisse werden im Kapitel 5 präsentiert.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Dissertation war die Synthesen von maßgeschneiderten thiolierten Raman-Farbstoffen und Untersuchung des Adsorptionsverhaltens dieser Farbstoffe auf verschiedenen Substraten für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung. Raman-Farbstoffe, als sogenannte Raman-Reporter, sind trifunktionelle (π -System, Thiol- oder Amino-Gruppen für Chemisorption und -COOH-Gruppen für Biokonjugation/Verkapselung) Bestandteile eines SERS-Raman-Markers, die auch entscheidendes Potential für Anwendungen in der Krebsdiagnostik haben. Die Synthesen und Eigenschaften von Raman-Reportern sind nicht besonders gut erforscht, im Gegensatz zu Metallsubstraten, die als plasmonische Oberflächen dienen sollen.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit sollten Rhodamin-basierte Reporter-moleküle synthetisiert werden (Abbildung 2.1).

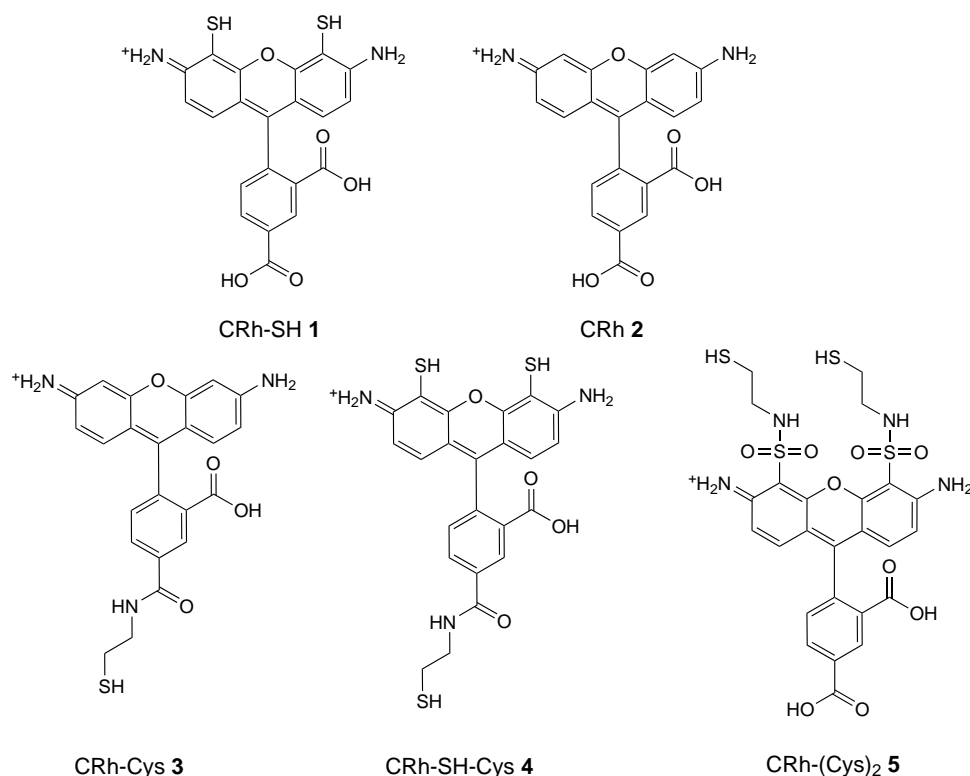


Abbildung 2.1: Exemplarische Darstellung der thiolierten Rhodamine

Die Adsorption von kationischen Rhodamin-Derivaten an Metalloberflächen findet bekannterweise elektrostatisch statt. Durch die direkte Einführung von Thiolgruppen in 5,6-Carboxyrhodamin (2) mittels einer Triphenylphosphin/Iod Reduktion wird die kovalente Anbindung des thiolierten Rhodamins (CRhSH) (1) mit dem kleinstmöglichen Abstand zur Metalloberfläche ermöglicht. Damit kann auch eine kontrollierte Adsorption des neuen Rhodamin-Raman-Reporters auf der Metallnanopartikeloberfläche gewährleistet werden. Die Adsorptionsgeometrie von Farbstoffmole-

2 Aufgabenstellung

kül (Raman-Reporter) auf der Metallnanopartikeloberfläche wird über die Aufnahme von experimentellen SERS-Spektren und korrespondierenden dichte-funktional-theoretischen Berechnungen (DFT) der Raman-Bandenmuster in Übereinstimmung gebracht. Dies ermöglicht auch abstandsabhängige SERS-Messungen von Molekül zur Oberfläche. Dazu sollen weitere thiolierte Rhodamine (**3**, **4** und **5**) hergestellt werden, welche durch eine Ethyleneinheit einen höheren Abstand des Raman-Reporters zur Metalloberfläche bei Bindung bewirken. Der Raman-Reporter (**4**) ist zudem theoretisch in der Lage bei geeigneter Adsorptionsgeometrie an zwei Nanopartikel in deren *hot spot* zu binden.

Im zweiten Teilprojekt standen lineare Polyene mit endständigen Thiolgruppen im Fokus (Abbildung 2.2). Monothiolierte (Abbildung 2.2 links) und dithiolierte (Abbildung 2.2 rechts) Polyene, deren Molekülstruktur sich vom β -Carotin ableitet, weisen zwei starke Raman-Banden auf (Streckschwingungen C-C-Einfach- und C=C-Doppelbindung). Eine Verschiebung der Schwingungsbanden tritt mit zunehmender Kettenlänge (Masseneffekt) auf^[16], sodass eine spektrale Unterscheidung der linearen Polyene möglich wird. Polyenartige Farbstoffe eignen sich ebenfalls für die Synthese von neuen SERS-Markern.

Zur Synthese von Polyen-Farbstoffen mit terminalen Thiolgruppen (Abbildung 2.2) soll eine Schutzgruppen-Strategie für die Schwefelatome entwickelt werden (Kapitel 5.6). Die Stabilisierung der linearen vinylischen Polyen-Ketten sollte mit zunehmender C=C-Kettenlänge durch die Einführung von terminalen Phenylringen ermöglicht werden (Abbildung 2.2 links Mitte), die zudem den Raman-Streuquerschnitt erhöhen sollten (Kapitel 5.6.3).

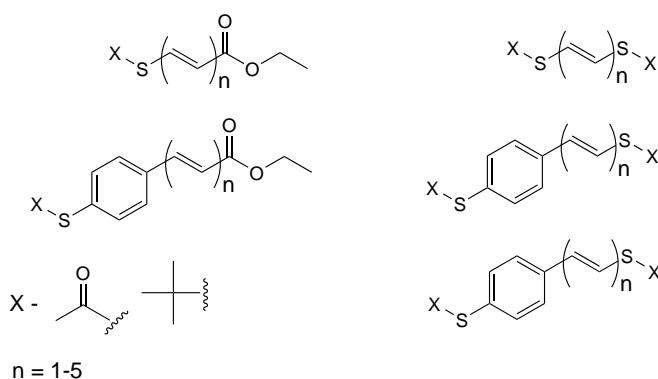


Abbildung 2.2: Exemplarische Darstellung der thiolierten Polyene

Absorptions- und Raman-spektroskopische Untersuchungen von Polyen-Raman-Reportern, wie zuvor bei Rhodaminen, sollten zur Charakterisierung der elektronischen Struktur herangezogen und mit computerunterstützten DFT-Berechnungen verglichen werden. Theoretische und experimentelle Daten zeigten gute Übereinstimmungen und sind in Kapiteln 5.7.2, 5.8.2, 5.7.3, 5.8.1 zusammengefasst. Die Raman-Aktivität sollte jeweils mit 4-Mercaptobenzoessäure als Referenz verglichen werden.

Die SERS-Aktivität der vinylischen Polyene sollte in kolloidaler Suspension und auf einem Goldnanopartikel-Goldfilm-Substrat untersucht werden. Die phenylischen thiolierten Polyene werden zunächst unter Verwendung von Gold-Nanosternen getestet. Die erfolgreichen Untersuchungen sind in Kapitel 5.7.1, 5.7.4 und 5.8.3 dargestellt.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Grundlagen der optischen Spektroskopie

Die optische Spektroskopie ist die wellenlängenabhängige Interaktion von Licht mit Molekülen, welche zu deren Charakterisierung verwendet wird. Bei der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie treten drei grundlegende Prozesse auf: Absorption, Lumineszenz (u.a. Fluoreszenz) und Streuung. Die zugrunde liegenden Prozesse werden im Nachfolgenden in Anlehnung an Le Ru and Etchegoin^[17] und weitere erläutert.

3.1.1 Absorption

Bei einem optischen Prozess wie der Absorption regt das einfallende Photon einen elektronischen Energieübergang im Molekül von einem niedrigeren Niveau der Energie E_i auf ein Niveau höherer Energie E_{i+1} an. Dabei gilt das Gesetz der Energieerhaltung $\Delta E = E_{i+1} - E_i$. Diese Übergänge finden statt, wenn die Dipol-Auswahlregeln erfüllt sind.^[17] Die optische Absorption ist wellenlängenabhängig und kann zu Unterschieden in den elektronischen oder vibronischen Zuständen führen. Bei der elektronischen Absorption wird ein Elektron aus einem besetzten Molekülorbital in ein energetisch höher gelegenes unbesetztes Molekülorbital angeregt. Häufig wird das Elektron aus dem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Zustand S_1 angehoben. Diese Übergänge treten für nicht-farbige organische Moleküle im UV-Bereich (200-400 nm) auf.^[17] Bei farbigen Moleküle, wie Rhodaminen oder β -Carotin, sind die elektronischen Übergänge mit Licht im sichtbaren Spektralbereich (400-800 nm) anregbar.^[17]

3.1.2 Streuung

Der Prozess der Streuung regt das System (Molekül) durch das einfallende Photon auf ein virtuelles (verbotenes) Niveau an. Es sind zwei Arten von Streuung bekannt. Das System relaxiert simultan in denselben Eigenzustand (elastische Streuung) oder in einen erhöhten Schwingungszustand (inelastische Streuung) zurück. Bei der elastischen Streuung haben das eingestrahlte und das gestreute Photon die gleiche Energie, können jedoch unterschiedliche Richtung und Polarisation besitzen. Nach einem solchen Streuvorgang, auch Rayleigh-Streuung (Abbildung 3.1 links) genannt, bleibt das Molekül im gleichen Energiezustand, da keine Energie vom Photon auf das Molekül übertragen wird. Nur wenige Informationen über die innere Molekülstruktur können mit Hilfe der Beobachtung dieses Prozesses erhalten werden. Man unterscheidet bei der elastischen Streuung zwischen Rayleigh- und Mie-Streuung.^[18] Die Rayleigh-Streuung tritt bei Systemen auf, welche kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes sind. Von Mie-Streuung spricht man bei der Interaktion von sphärischen Objekten in der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes.

Stattdessen erfolgt bei der inelastischen Streuung eine Energieübertragung vom eingestrahnten

Photon auf das System, welche in einer Schwingungsänderung des Moleküls resultiert. Durch die Änderung des Schwingungszustandes des Moleküls können Rückschlüsse auf dessen Struktur gezogen werden. Die Raman-Streuung ist ein Beispiel für einen inelastischen Streuprozess mit entsprechenden Übergängen von Rotations- und Schwingungszuständen und einer gleichzeitigen Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls. Der inelastische Streuprozess kann auf zwei Arten ablaufen. Wenn das gestreute Photon eine geringere Energie E_S als das einfallende Photon E_L besitzt (Abbildung 3.1), wird das Molekül in einen Zustand mit höherer Energie $E_L - E_S$ angeregt. Bei diesem so genannten Stokes-Prozess (Abbildung 3.1 Mitte) erfolgt die Anregung des Moleküls aus dem Schwingungsgrundzustand $v=0$ in den ersten angeregten Schwingungszustand $v=1$ mit der Energie $\hbar\omega_\nu = E_L - E_S$, wobei $\hbar\omega_\nu$ die Energie des Schwingungsübergangs beschreibt. Besitzt dagegen das gestreute Photon eine größere Energie als das eingestrahelte Photon ($E_S > E_L$), so relaxiert das Molekül aus einem angeregten Zustand $v=1$ in den Grundzustand $v=0$. Der Beitrag der Schwingungsenergie ist nun $\hbar\omega_\nu = E_S - E_L$. In diesem Fall spricht man von dem Anti-Stokes-Prozess (Abbildung 3.1 rechts).

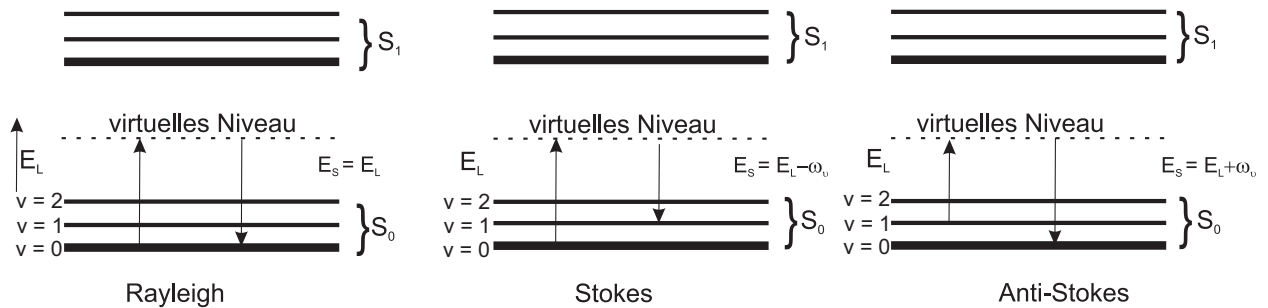


Abbildung 3.1: Energieniveauschema für elastische (Rayleigh) und inelastische (Stokes und Anti-Stokes) Raman-Streuung.

3.2 Raman-Effekt

Zum ersten Mal wurde die Raman-Streuung von C.V. Raman und K.S. Krishnan im Jahr 1928 experimentell vorgestellt.^[19] A.Smekal beschrieb das Phenomen 1923 theoretisch.^[20] Während C.V. Raman den nach ihm benannten Effekt an Lösungsmitteln zeigte, wurde zur gleichen Zeit von Landsberg und Mandelstam^[21] derselbe Effekt an Festkörpern vorgestellt. Bei der klassischen Beschreibung wird der Raman-Effekt als eine Wechselwirkung eines Moleküls mit Licht beschrieben. Beim Auftreffen der elektromagnetischen Welle mit einer bestimmten Frequenz und der elektrischen Feldstärke $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ auf ein Molekül, wird ein oszillierendes Dipolmoment im Molekül induziert.

$$\vec{\mu} = \bar{\alpha} \vec{E} \quad (3.1)$$

Dabei ist $\bar{\alpha}$ die richtungsabhängige Polarisierbarkeit der Materie und wird durch einen zweistufigen Tensor beschrieben.

$$\bar{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

Ist die Energie der einfallenden elektromagnetischen Strahlung sehr viel kleiner als die Energie für einen elektronischen Übergang, schwingen die Kerne nah um die Gleichgewichtslage. Aus der

Gleichung 3.1 können klassisch mittels einer Reihenentwicklung um die vibronische Gleichgewichtslage des Moleküls die Terme für die Rayleigh-, Stokes- und Anti-Stokes-Streuung erhalten werden. Dazu wird die Polarisierbarkeit für eine Normalmode nach ihrer Normalkoordinate q_α entwickelt. Setzt man die elektrische Feldstärke in Gl. 3.1 ein, und führt eine klassische Reihenentwicklung durch, erhält man für das Dipolmoment:

$$\begin{aligned}\vec{\mu} = & \bar{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial q_\alpha} \right)_0 \vec{E}_0 A_{vib} \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial q_\alpha} \right)_0 \vec{E}_0 A_{vib} \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t).\end{aligned}\quad (3.3)$$

Der erste Term der Gleichung beschreibt die Rayleigh-Streuung. Der zweite Term beschreibt durch $\nu_S = \nu_0 - \nu_{vib}$ die Stokes-Streuung. Im dritten Term wird die Frequenz des Streulichts erhöht, welches als die Anti-Stokes-Streuung beschrieben wird ($\nu_{AS} = \nu_0 + \nu_{vib}$). Die Reihenentwicklung nach Taylor wird nach dem zweiten Glied abgebrochen. Die Terme höherer Ordnung werden als Raman-Effekt zweiter, dritter,... Ordnung bezeichnet ($\nu_0 \pm 2\nu_{vib}, \nu_0 \pm 3\nu_{vib}, \dots$). Experimentell wird die Ramanverschiebung gemessen und ist gegeben durch die Gleichung 3.4

$$\nu_{exp} = \nu_0 - \nu_{AS,S} = \mp \nu_{vib}. \quad (3.4)$$

Der Besetzungsgrad der Schwingungszustände im Molekül beeinflusst die Intensitätsverteilung der Anti-Stokes- und Stokes-Banden. Im thermischen Gleichgewicht wird der Besetzungsgrad nach der Boltzmann-Verteilung bestimmt. Die Intensität I des Hertzschen Dipols ist dabei proportional zu dem Betragsquadrat der zweiten zeitlichen Ableitung des Dipolmoments.^[22]

$$I \propto |\ddot{\mu}|^2 \quad (3.5)$$

Die Intensitätsverteilung zwischen Anti-Stokes- und Stokes-Banden wird mit dem folgenden Ausdruck beschrieben:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_{vib}}{\nu_0 - \nu_{vib}} \right)^4 \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{E_{vib}}{k_b T}} \quad (3.6)$$

Der Entartungsgrad von Schwingungszuständen ist $g_n = 2J_n + 1$. Die Besetzung eines angeregten Zustands ist um den Faktor $e^{-\frac{E_{vib}}{k_b T}}$ kleiner als der Grundzustand. Deswegen sind die Intensitäten der Anti-Stokes-Banden bei Raumtemperatur ca. um 100-fache geringer als die Intensitäten der Stokes-Banden. Außerdem besagt die Gleichung 3.3, dass nur die Normalmoden Raman-aktiv sind, bei denen die Änderung der Polarisierbarkeit $\bar{\alpha}$ bezüglich der Normalkoordinate beim Durchgang durch die Gleichgewichtslage ungleich null ist ($\left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial q} \right)_0 \neq 0$).

3.3 Luminenz, Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Der Prozess der Lumineszenz ist die Beschreibung eines physikalischen Systems, welches extern zugefügte Energie nicht in thermische Energie verwandelt, sondern in einen Absorptions- oder Emissionsprozess übergeht.^[17] Bekannte Beispiele für Lumineszenzprozesse sind die Fluoreszenz und Phosphoreszenz.^[17, 23]

Ein eingestrahktes Photon mit einer zur Frequenz f dazugehörigen Energie E_L regt im Molekül ein Elektron an, welches vom elektronischen Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 übergeht. Meistens erfolgt eine Anregung in ein erhöhtes Schwingungsniveau des elektronischen Zustandes S_1 und nicht in dessen Grundzustand. Eine Relaxation zum S_1 -Grundzustand erfolgt dann durch Energieabgabe in Form von Schwingungsquanten an die Umgebung über mehrere energetisch tiefer liegende Schwingungsniveaus bis in den Schwingungsgrundzustand $v=0$ von S_1 . Dementsprechend angeregte Elektronen verbleiben meist zwischen 1-100 ns (Fluoreszenzlebensdauer) auf dem Grundzustand des S_1 -Niveaus, bevor sie spontan auf das S_0 -Niveau zurückfallen unter Emission eines zum Anregungslicht rotverschobenen Photons (Fluoreszenz).^[17]

Die Phosphoreszenz ist ein weiterer Lumineszenzprozess, ähnlich zur Fluoreszenz, wobei der angeregte Energiezwischenzustand für eine gewisse Zeit einzufrieren scheint. Angeregte Elektronen des S_1 -Niveau (Singulett-Zustand) gehen durch Interkombination (engl. *intersystem crossing*, ISC) in den elektronischen Triplett-Zustand T_1 über. Das T_1 -Niveau besitzt eine geringere Energie als das S_1 -Niveau. Da dieser Übergang normalerweise spin-verboten ist, wird eine gewisse Zeit für den Interkombinationsprozess benötigt. Von diesem Triplett-Zustand T_1 fällt das Elektron auf den elektronischen Grundzustand S_0 spontan unter Aussendung eines rotverschobenen Photons zurück. Das dabei emittierte Photon besitzt eine noch niedrigere Frequenz (höhere Wellenlänge, stärkere Rotverschiebung) als das beim Fluoreszenzprozess auftretende bereits rotverschobene Photon. Durch die zeitliche Verzögerung bei der Interkombination tritt die Phosphoreszenz zudem später auf als die Fluoreszenz. Die Phosphoreszenzlebensdauern können abhängig von dem jeweiligen System zwischen einer μs bis mehrere Stunden betragen.

3.4 Extinktion

In Suspensionen mit metallischen Nanopartikeln können Prozesse wie Absorption, Beugung, Streuung oder Reflexion auftreten. Die wellenlängenabhängige Transmission einer Suspensionsprobe kann zur Charakterisierung herangezogen werden. Durch die obengenannten Prozesse, wie Absorption und elastische Streuung, wird die Intensität der einfallenden elektromagnetischen Strahlung beim Durchgang durch die Probe reduziert. Diese transmittierte Intensität I_T ist geringer als die einfallende Intensität I_0 . Für Moleküle kann die Streuung vernachlässigt werden und es gilt $I_{Ext} \approx I_{Abs}$.

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Extinktion von Molekülen in Lösung oder von Nanopartikel-Suspensionen bestimmt werden:

$$E = -\lg(T) = \lg\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \epsilon c d \quad (3.7)$$

I_T ist die durch die Probe transmittierte Intensität, während I_0 die eingestrahkte Intensität des Lichtes beschreibt. c ist die Konzentration der absorbierenden Probe. d ist die Weglänge des Lichts durch die Probe. ϵ_λ ist der wellenlängenabhängige, substanzspezifische Extinktionskoeffizient, und ist zur Vergleichbarkeit meistens für eine Weglänge von $d=1$ cm angegeben mit der Einheit $(Lcm^{-1}mol^{-1})$.^[17] Für Moleküle ist der Extinktionskoeffizient eine substanzspezifische Größe, welcher bei bekannter Konzentration und bekannter Wellenlänge einfach bestimmt werden kann. Bei Nanopartikeln ist der Extinktionskoeffizient aber nicht nur materialabhängig, sondern auch größenabhängig. Daher kann für eine Nanopartikelsorte kein einheitlicher Extinktionskoeffizient

angegeben werden, sondern muss für jede Probe und Größe jeweils neu bestimmt werden.^[17]

3.5 Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz

Licht als elektromagnetische Welle kann mit Nanopartikeln wechselwirken. Besonders die freien Elektronen in metallischen Nanopartikeln können durch Licht beeinflusst werden. Klassisch beschrieben regt das Licht die Elektronen im Metall zum Schwingen an, die quantisierten Ladungsträgerschwankungen werden Plasmonen genannt. Gold und Silber als sogenannte plasmomische Materialien wechselwirken besonders gut mit Licht bestimmter Wellenlänge. In der Abbildung 3.2 ist die Wechselwirkung einer elektromagnetischen Welle mit einem metallischen Nanopartikel schematisch dargestellt. Ist die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes größer als der Durchmesser des Nanopartikels, so kann diese elektromagnetische Welle das Partikel komplett durchdringen. Das elektrische Wechselfeld E_0 regt die Leitungsbandelektronen des Metalls zu Schwingung an. Die Coulomb-Anziehung zwischen den positiv geladenen Atomrümpfen und der ausgelenkten Elektronenwolke wirkt als Rückstellkraft im oszillierenden System. Das ganze System wird als ein harmonischer Oszillator betrachtet, bei dem die Elektronen mit der Frequenz der Anregungswellenlänge schwingen. Dieser Schwingung der Leitungsbandelektronen wird ein Quasi-Teilchen zugeordnet und als ein lokalisiertes Oberflächenplasmon definiert. Der gesamte Oszillator wird als ein Herzsches Dipol betrachtet, welcher die Energie in Form von Licht wieder abstrahlt und ein lokales elektrisches Feld um das Partikel entsteht. Die Intensität der gestreuten Strahlung für ein bestimmtes System ist frequenzabhängig, da die Resonanzbedingungen im Partikel erfüllt werden müssen.^[24, 25]

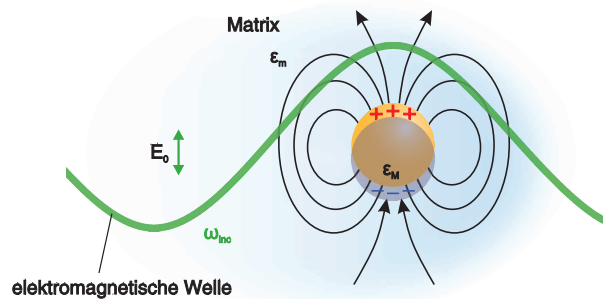


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Entstehung eines lokalisierten Oberflächenplasmons. Das elektrische Wechselfeld E_0 mit der Frequenz ω_{inc} regt die Leitungsbandelektronen des Metalls zu Schwingung an.

3.6 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung

Erstmals wurde die oberflächenverstärkte Raman-Streuung von Fleischmann *et al.* beobachtet. Die Verstärkung des Raman-Signals von Pyridin wurde bei der Verwendung einer rauen Silberoberfläche beobachtet.^[26] Zur Erklärung des exakten Mechanismus wurden elektromagnetische Theorie und chemische Theorie entwickelt.^[27, 28] Im Jahr 1977 stellte Van Duyne die These auf, dass die Raman-Intensitätsverstärkung von einem elektromagnetischen Feldeffekt hervorgerufen

wird, der von der einfallenden elektromagnetischen Welle erzeugt wird.^[29] Dabei spielt das auf der Oberfläche adsorbierte Molekül eine untergeordnete Rolle. Zeitgleich behauptete Creighton, dass die Erhöhung der Raman-Intensität von der Anzahl der adsorbierten Moleküle hervorgerufen wird.^[30] In der parallel aufgestellten chemischen Theorie werden die chemisorbierten Moleküle auf der Metalloberfläche und deren freien Elektronenpaare, sowie die HOMO zu LUMO Übergänge betrachtet. Die chemische Theorie erklärt den hohen Raman-Signalverstärkungsfaktor unabhängig von der elektromagnetischen Theorie.^[31]

3.6.1 Elektromagnetische Verstärkung

Befindet sich ein Molekül in der Nähe eines Edelmetall-Nanopartikels wird das Raman-Signal um einen bestimmten Faktor V verstärkt. Dieser setzt sich aus dem Beitrag des lokalen elektrischen Feldes mit einer Anregungsfrequenz ω und der Feldstärke bei der Stokes-Verschiebung mit der Frequenz ω_1 zusammen^[31]

$$V = |\vec{E}(\omega)|^2 |\vec{E}(\omega_1)|^2. \quad (3.8)$$

Die Abbildung 3.3 illustriert schematisch die elektromagnetische Feldverstärkung. Auf das Molekül wirken das elektrische Feld E_0 und das elastisch gestreute Feld vom Metall-Partikel E_{LM} . Der Betrag von E_{LM} nimmt mit sich verkleinerndem Abstand zwischen Molekül und Nanopartikeloberfläche um den Faktor $\frac{1}{d^3}$ zu. Der maximale Verstärkungseffekt wird beobachtet für Moleküle, die sich direkt auf der Oberfläche des Nanopartikels befinden.

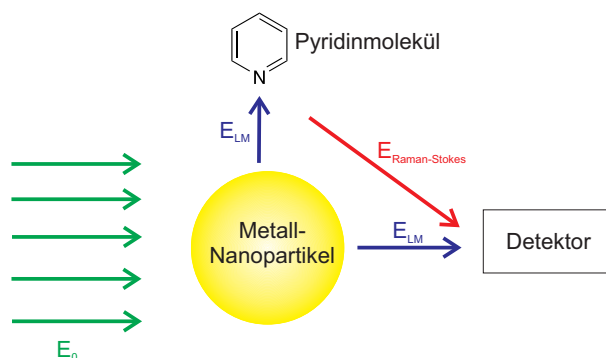


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der SERS-Verstärkung am Metall-Nanopartikel.

Durch das erhöhte elektrische Feld aus E_0 und E_{LM} , welches nun auf das Molekül wirkt, werden mehr Photonen elastisch und inelastisch gestreut. Die Streustrahlung kann ebenso wieder mit dem Nanopartikel wechselwirken und so verstärkt werden oder direkt zum Detektor gelangen.^[31] Die SERS-Verstärkung nimmt für ein sphärisches Partikel mit $(\frac{r+d}{r})^{-10}$ ab, wobei r der Radius des Partikels und d den Abstand des Moleküls zur Oberfläche beschreiben.^[32] Die Abstandsabhängigkeit der SERS-Verstärkung wurde von Kennedy im Jahr 1999 nachgewiesen.^[32] Zu den idealen SERS-Substraten zählen Edelmetall-Nanopartikel mit einem großen Streuquerschnitt.^[31] Eine besonders starke SERS-Verstärkung wurde bei gekoppelten Plasmonen beobachtet.^[31] Plasmonen können koppeln, wenn Nanopartikel aggregieren. In den Lücken mit den geringsten Abständen zwischen den Partikeln bilden sich starke elektromagnetische Felder mit einer hohen Feldverstärkung (engl. *hot spots*). SERS-Verstärkungsfaktoren von 10^{15} sind für die *hot spots* von aggregierte Silber-Nanopartikel dabei möglich.^[33] Zahlreiche Nanopartikel-Aggregate mit un-

terschiedlicher Morphologie, Dimere, Trimere, allgem. Oligomere, Gold-Nanosterne^[34], Au/Pt/Au-Nanohimbeeren^[35] und Gold-Nanoantennen^[36] sind bekannt.

3.6.2 Chemische Verstärkung

Der SERS-Verstärkungsfaktor durch die elektromagnetische Feldverstärkung liegt zwischen 10^6 und 10^{11} .^[25, 17] Die chemische Verstärkung wurde mit einem Wert von ca. 10^2 bestimmt.^[25] Aus der Gleichung 3.1 ist zu entnehmen, dass der chemische Verstärkungseffekt auf eine Erhöhung der Polarisierbarkeit zurückzuführen ist. Zur Beschreibung dieser Art der Verstärkung sind Theorien, wie adsorbatlokalisierte Resonanzeffekte oder Resonanzen bei Ladungstransfer-Komplexen (engl.: *charge transfer*, CT) vom Metall zum Adsorbat bekannt.^[37, 38] Obwohl die theoretischen Daten nur eine geringe chemische Verstärkung voraussagen, wurde experimentell von Schütz *et al.* durch die Untersuchung verschiedener Raman-Reportermoleküle an Gewebeschnitten die Wichtigkeit der chemischen SERS-Verstärkung bestätigt.^[39]

3.6.3 SERS-Auswahlregeln

Bei der Adsorption eines Raman-aktiven Moleküls an einer SERS-Substratoberfläche werden nicht alle Schwingungsbeiträge gleichmäßig verstärkt.^[40] Für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung gelten andere Auswahlregeln als für normale Schwingungsspektroskopie, da jedes Molekül eine eigene Geometrie der Adsorption an der Metalloberfläche aufweist. Daher erscheinen einzelne Beiträge mit veränderten Intensitätsverhältnissen in einem SERS-Spektrum. In einem lokalen kartesischen Koordinatensystem mit der z-Achse parallel zur Normalen der Metalloberfläche kann der Raman-Tensor $\bar{\alpha}_{eff}$ für ein auf einem sphärischen Nanopartikel adsorbiertes Molekül aufgestellt werden:^[40]

$$\bar{\alpha}_{eff} = \frac{9}{[\varepsilon(\omega_0) + 2][\varepsilon(\omega_S) + 2]} \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \varepsilon(\omega_S)\alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \varepsilon(\omega_S)\alpha_{yz} \\ \varepsilon(\omega_0)\alpha_{zx} & \varepsilon(\omega_0)\alpha_{zy} & \varepsilon(\omega_0)\varepsilon(\omega_S)\alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

$\varepsilon(\omega_0)$ stellt hier die dielektrische Konstante des Metalls bei der Anregungskreisfrequenz ω_0 dar. $\varepsilon(\omega_S)$ stellt die dielektrische Konstante bei der Raman-Streulichtkreisfrequenz ω_S dar. Letzteres zeigt, dass nur Schwingungsmoden mit einem z-Anteil des Tensors ungleich Null verstärkt werden können. Somit werden Schwingungen entsprechend ihrer Orientierung zur Oberfläche unterschiedlich verstärkt, sodass sich das Intensitätsbandenverhältnis im SERS-Spektrum zum Raman-Spektrum verändert.^[40]

3.7 Oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Effekt (SERRS)

Verwendet man eine elektromagnetische Welle passender Frequenz zu entsprechenden elektronischen Übergängen der auf plasmonischen Oberfläche adsorbierten Moleküle und regt diese damit resonant an, so spricht man vom oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Effekt (SERRS). Die elektronischen Übergänge werden zusätzlich zu Molekülschwingungsübergängen angeregt.^[41] In der Abbildung 3.4 ist der Resonanz-Effekt schematisch dargestellt.

3 Theoretische Grundlagen

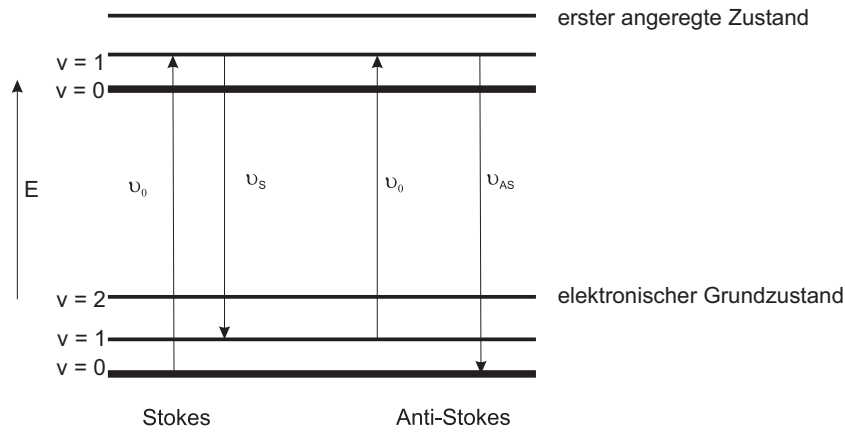


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Resonanz-Raman-Effektes. Links: Resonanz-Stokes-Streuung, rechts: Resonanz-Anti-Stokes-Streuung.

Bei der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Spektroskopie wird das Metall plasmonisch resonant so angeregt, dass direkt ein erlaubter elektronischer Übergang der Moleküle induziert (ν_0) wird. Die Elektronen relaxieren vom angeregten elektronischen Zustand ($v=1$) auf ein höheres Schwingungsniveau vom ursprünglich angeregten Schwingungsgrundzustand zurück ($v=1$), was einer Aussendung eines rotverschobenen inelastischen (Stokes) Streulichtes entspricht (ν_S). Es kann auch ein energetischer tieferer Schwingungsgrundzustand ($v=0$) erreicht werden, was zur Aussendung eines blauverschobenen inelastischen (Anti-Stokes) Streulichtes führt (ν_{AS}). Das Molekül, welches in der Regel ein Chromophor ist, absorbiert dabei im denselben Frequenzbereich wie das eingestrahlte Licht, was zu einer Verstärkung der sonst schwächeren Raman-Streuung (inelastische Streuung) führt. Durch die resonante Anregung werden einige Tensorkomponenten der Molekülpolarisierbarkeit (siehe Gleichung 3.1) stärker erhöht als nur bei SERS. Durch den SERRS-Effekt kann eine Signalverstärkung von drei bis vier Größenordnungen stärker als bei SERS erhalten werden.^[17] Am besten kann die Resonanz-Raman-Streuung quantenmechanisch beschrieben werden^[42, 43, 44], hier wird sich auf eine qualitative Beschreibung beschränkt.

4 Stand der Forschung

4.1 Aufbau von SERS-Nanopartikeln

SERS-aktive Nanopartikel (SERS-NP) bestehen aus Edelmetall-Nanopartikel, die Raman-aktive Substanzen, als sogenannte Raman-Reporter, auf der Nanopartikeloberfläche enthalten.^[45, 46] Das ausgesendete Raman-Spektrum der Reportermoleküle ist unverwechselbar charakteristisch, verstärkt durch das Edelmetall-Nanopartikel, das als optischer Verstärker (Nanoantenne) bei resonanter Plasmonenanregung mit Licht geeigneter Frequenz dient.

Raman-aktive Verbindungen mit funktionellen Gruppen wie Thiole, Isothiocyanate oder Amine, eignen sich gut für eine Raman-Markierung von Edelmetall-Nanopartikel aufgrund der hohen Oberflächenbindungsaffinität zu Gold und Silber.^[39, 47] Porter und Mitarbeiter haben Arylthiole/-Disulfide als Raman-Reporter eingeführt, weil diese selbstorganisierte Monolagen (SAM) auf Goldoberflächen ausbilden.^[48] Eine signifikante Verbesserung der Partikelstabilität und Wasserlöslichkeit sowie der Biokonjugation von SAM-basierten SERS-NP wurde durch die Einführung von kovalent an die Raman-Reporter gebundenen Ethylenglykoleinheiten erzielt.^[49] Kurze Monoethylenglykoleinheiten (MEG-OH) und längere Triethylenglykoleinheiten (TEG-COOH) sorgen für die hydrophile Stabilisierung des SERS-NP. Die Biokonjugation erfolgt über die sterisch gut zugänglichen Carboxytermini der TEG-COOH-Abstandshalter.^[50]

Bei der Wahl von Raman-Reportermolekülen zur Verwendung in SERS-Nanopartikel sind folgende Kriterien zu beachten:

- 1) Moleküle mit einer kleinen Anzahl von Atomen, die eine stabile Monolage ausbilden können, sind geeignet.
- 2) Für eine hohe Sensitivität benötigen die Raman-Reportermoleküle stark polarisierbare funktionelle Gruppen, wie Doppel- und Dreifachbindungen.
- 3) Zur erfolgreichen Chemisorption auf der Metalloberfläche werden funktionelle Gruppen, wie Thiol- oder Aminogruppen im Raman-Reportermolekül benötigt.
- 4) Die Molekülsymmetrie bestimmt die Anzahl der Raman-aktiven Moden und die Möglichkeit ihrer Detektion.
- 5) Geeignete Auswahl von Molekülen mit geeigneten Symmetrien und deren Fähigkeit stabile Monolagen auszubilden, minimieren spektrale Überlappungen des ausgesendeten Raman-Signals und lassen Mehrfarben-Raman-Detektion zu.

Die maximale Quantenausbeute wird bei resonanter Anregung vom Nanopartikel und Raman-Reportermolekül erreicht (sog. resonantes SERS = SERRS).

Für den Zweck der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Streuung (SERRS, *surface-enhanced*

resonance Raman scattering) werden deshalb bestimmte Raman-Farbstoffe verwendet. Graham *et al.* verwendeten für den Mehrfarben-DNA-Nachweis Benzotriazole (Abbildung 4.1 B) und kommerziell erhältliche Farbstoffe wie Cy5, FAM und ROX.^[47] Chang *et al.* präsentierten die Synthese von NIR-Raman-Reportern für Multiplex-SERRS mit NIR-Laseranregung (Abbildung 4.1 A).^[51, 52] Lambert und Schlücker *et al.* veröffentlichten Design und Synthese von olefinischen und Alkinartigen Raman-Reportermolekülen mit starken Schwingungs-Raman-Banden für die Markierung von Gewebeschnitten (Abbildung 4.1 C).^[39] Detty und Kirchner verwendeten Chalcogenopyrylium-basierte Farbstoffe für SERRS-Experimente (Abbildung 4.1 D).^[53] In den folgenden Kapiteln werden die Farbstoff-Klassen Rhodamine und Carotinoide ausführlicher vorgestellt.

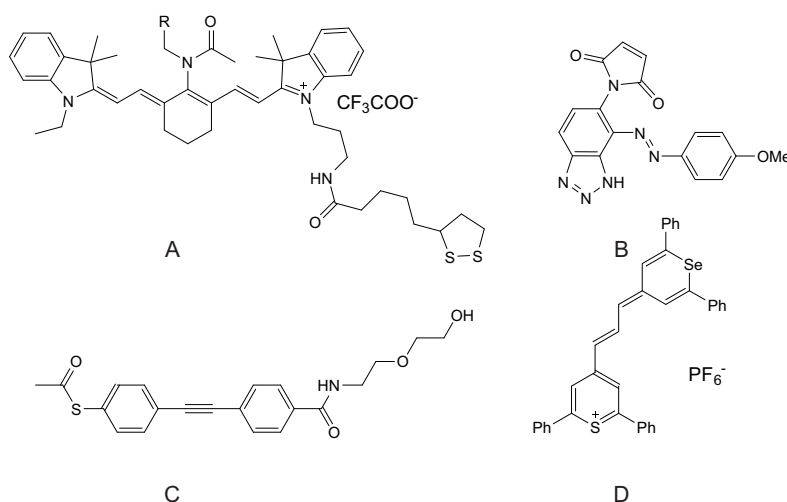


Abbildung 4.1: A: Nahinfrarot-Raman-Farbstoff für Multiplex-SERRS^[51, 52]; B: Benzotriazol-basierter Farbstoff für Mehrfarben-DNA-Experimente^[47]; C: Alkin-basierter thiolierter Raman-Farbstoff für SERS an Gewebeschnitten^[39]; D: Chalcogenopyrylium-basierter Farbstoff für SERRS^[53].

4.2 Einsatz von Xanthen-Farbstoffen in SERS/SERRS

Rhodamine sind Xanthen-basierende Farbstoffe, eingesetzt oft in der Fluoreszenz-Spektroskopie und -Mikroskopie. Fluoreszenzfarbstoffe, wie die Alexa Fluor Reihe (Fa. *Thermo Fisher Scientific*) zählen mit zu den bekanntesten hydrophilen und photostabilen Rhodamin-Farbstoffen. Im Vergleich zu Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist zum Beispiel Alexa 488 photostabiler, besitzt eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute und ist pH-stabiler.^[54] Rhodamin 6 G wird wegen des großen Streuquerschnittes oft in der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS), in der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS) und auch in der spitzenverstärkten Raman-Streuung (engl. *tip-enhanced Raman scattering*, TERS) eingesetzt.^[55, 56, 57, 58] Die hohe Photostabilität und der große Raman-Streuquerschnitt (großes π -System) des Chromophors, bewirken zusammen mit der inhärenten elektronischen Resonanz eine zusätzliche Signalverstärkung. Rhodamin 6 G ist somit ideal für die Anwendung als Raman-Reportermolekül für die Einzelmolekül-SERS.^[59] In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls die Verstärkung des Raman-Signals bezüglich der Adsorptionsgeometrie und Adsorptionsart (bspw. kovalent, elektrostatisch) der Rhodamin-Moleküle auf plasmonischen Oberflächen untersucht. So detektierten Li

et al. die maximale Signalverstärkung für Rhodamin 6 G, wenn der Raman-Reporter über die sekundären Aminogruppen an der Xanthen-Einheit senkrecht zu der AgNP-Oberfläche adsorbieren. Durch eine Amino-Modifizierung von Rhodamin 6 G am unteren Phenylring konnte das SERS-Signal nicht verbessert werden.^[60] Yajima *et al.* verglich das Adsorptionsverhalten von Rhodamin 123 in kationischer und neutraler Form auf AuNP und AgNP. Es wurde gezeigt, dass positive und neutrale Farbstoffmoleküle eine unkontrollierte Aggregation des Kolloids hervorrufen. Für chemisorbierte, neutrale Rhodamin-Moleküle und elektrostatisch angelagerte positive Rhodamine 123 wurde zur Erklärung der unterschiedlichen SERS-Spektren, unterschiedliche Adsorptionsgeometrien angenommen.^[61] Die Anzahl von Rhodamin-Farbstoffmolekülen auf Silbernanopartikeloberflächen und die verbesserte Ausbildung von selbstorganisierten Monolagen konnte durch die Einführung von Thiolgruppen durch Zengin *et al.* optimiert werden, im Gegensatz zur nicht kovalenten Anbindung.^[62]

4.3 Einsatz von Carotinoiden in SERS/SERRS

Seit der Entdeckung des Polyacetylens als elektrisch leitendes Polymer^[63] werden die linearen konjugierten Olefine wegen der elektronischen Eigenschaften des π -Systems immer mehr in der Raman-, SERS/SERRS-, Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie eingesetzt.^[64, 65, 66] β -Carotin ist das bekannteste und das längste Beispiel für ein natürliches Polyen (20 Doppelbindungen). β -Carotin wurde bereits im Jahr 1932 mittels Raman-Spektroskopie untersucht.^[67] Weitere SERS-Untersuchungen an β -Carotin sind bekannt.^[68, 69] Die optischen und elektronischen Eigenschaften von linearen Polyen-Ketten hängen von der Länge der C=C-Doppelbindungskette, sowie von Substituenten wie Methyl-, *tert*-Butyl oder Cyano-Gruppenklasse ab.^[70] Daher wurden in den letzten 30 Jahren verschiedene Synthesen von linearen Olefinen entwickelt. So wurde das einfachste Polyen in einer Reaktion von Polyenal mit einem vinylischen Grignard-Reagenz mit anschließender Dehydratisierung synthetisiert.^[71, 72] Des Weiteren liessen sich Polyenale mit einem vinylischen Wittig-Reagenz in einer Wittig-Reaktion verknüpfen.^[73, 74] Polyene mit mehr als acht konjugierten Doppelbindungen wurde in einer Palladium-katalysierten Kupplung von Silyl-modifizierten Olefinen erhalten.^[75] Langkettige Polyene, die nicht durch sterisch-anspruchsvolle Substituenten geschützt waren, oxidierten schnell an Luft. Außerdem können Cycloadditionen, Polymerisation oder Verlust der Stereochemie stattfinden. Deshalb sind nicht so viele unsubstituierte Polyene literaturbekannt. Whiting stellte als einer der Ersten das terminal Methyl-substituierte Polyen her.^[76] Ebenso präsentierte Christensen ein Polyen mit sieben Doppelbindungen, welches terminal durch Methylgruppen stabilisiert wurde. Die Einführung von Phenyl- und *tert*-Butyl-Gruppen lieferte mehr Stabilität, so dass Polyene mit bis zu 15 Doppelbindungen synthetisiert werden konnten.^[65, 76]

Weitere Anwendungen für β -Carotin liegen bspw. in der Verwendung als molekulare Drähte für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit.^[77] Besonders gut eignen sich dithiolierte Polyen-Ketten für die Leitfähigkeitsmessungen, weil diese einen direkten elektrischen Kontakt über eine kovalente Bindung zur Metalloberfläche ausbilden können. Batista und Artacho führten theoretische Leitfähigkeitsuntersuchungen an einem dithiolierten Polyen mit vier Doppelbindungen durch, welches zwischen zwei Elektroden immobilisiert wurde.^[78] Rabitz präsentierte im Jahr 2014 seine theoretische Arbeit zur Untersuchung des Elektronentransfers bei einem dithiolierten Polyen mit zehn Doppelbindungen.^[79] Meisner nutzte Polyene mit einer Kettenlänge von zwei bis sechs Doppelbin-

dungen als elektrischen Leiter. Die Thiol-Termini wurden durch Methylgruppen geschützt und die Stabilität der Kette konnte durch die Einführung von Phenylringe erreicht werden. Weiter wurde die elektrischen Eigenschaften der synthetisierten Polyene durch die Einführung der elektronenziehenden Cyano-Gruppen beeinflusst.^[80, 81]

4.4 SERS-Substrate

SERS-Substrate können auf verschiedenen Wegen erzeugt werden. Dazu eignen sich Edelmetallnanopartikel in kolloidaler Suspension oder nanolithographisch erzeugte Nanostrukturen. Das Ziel ist dabei eine geometrische Anordnung, die starke Feldüberhöhungen bei Lichteinstrahlung zulassen. Die Elektronenstrahlolithographie ist eine von mehreren Methode zur Herstellung von Nanostrukturen (Nanoantennen) auf einem Substrat. Optische Nanoantennen können in verschiedenen Formen auftreten, z.B. in Form eines Diskus^[82], Dreiecks^[83], Dimere^[84] oder Trimere.^[85] Kopplungen zwischen den Antennen sind ebenfalls möglich. Abstände bis zu 2 nm zwischen den einzelnen Objekten sind machbar. Jedoch ist die reproduzierbare Herstellung solcher Nanostrukturen nicht immer möglich. Nanoantennen eignen sich für bioanalytische Anwendungen^[86] und für Einzelmolekül-SERS.^[87] Plasmonisch aktive Nanopartikel können als Antennen in Suspension betrachtet werden. Kolloidale Systeme können für verschiedene SERS-Anwendungen (maßgeschneiderte SERS-Marker) verwendet werden. Abhängig vom Anwendungsgebiet und vom Analyten werden Gold-Nanopartikelkolloide bei grüner bis nahinfraroter (514-785 nm) und Silber-Kolloide bei blaugrün bis roter (488-633 nm) Laseranregung eingesetzt.

Die optischen Eigenschaften der Kolloide können durch Variation von Material, Form und Größe weiter variiert werden, ähnlich zu lithographisch hergestellten Nanostrukturen.

Einzelne sphärische Gold- und Silber-Nanopartikel verstärken nur schwach das Raman-Signal.^[88] Dagegen verbessern schon 60 nm große Gold-Silber Nanoschalen im Vergleich zu sphärischen Nanopartikeln mit derselben Größe das SERS-Signal um das Achtfache.^[89]

Gold-Nanosterne (52 nm) verstärken das SERS-Signal um den Faktor 5×10^3 .^[90] Eine Assemblierung von zwei Nanopartikeln führt zu einer Kopplung von Plasmonen beider Partikel und zur Generierung eines *hot spots*. Die Feldverstärkung ist dabei so stark, dass ein Nachweis von einzelnen Molekülen mittels SERS-Spektroskopie möglich ist.^[33] Thomas ermittelte einen Verstärkungsfaktor von 1.5×10^5 im *hot spot* eines Ag-Nanopartikeldimers bei einem Abstand unter 5 nm.^[91] Daher werden SERS-Marker gerne als Dimer synthetisiert, was die Signalverstärkung im *hot spot* ausnutzt und die Bildgebung in Gewebeschnitten verbessert.^[92] Weiter werden auch elektrochemisch aufgeraute Elektroden^[93] und Metallfilme oder Metallinseln^[94] oder dichtgepackte Nanopartikelinseln auf Gold-oder Silizium-Substraten^[95, 96] als SERS-Substrate verwendet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Organisch-chemische Synthese und optisch-spektroskopisch Charakterisierung von neuen thiolierten Rhodaminen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Synthesen zur Herstellung von neuen thiolierten Rhodaminen zur Anwendung als Raman-Farbstoffe und deren spektroskopische Untersuchungen vorgestellt.

Zu Beginn wird die Synthese von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**1**) präsentiert. Die Abbildung 5.1 zeigt die drei möglichen Synthesewege zu **1**. 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) wurde als Ausgangssubstanz ausgewählt und ist selbst bereits ein Raman-aktives Molekül (Abbildung 5.15).

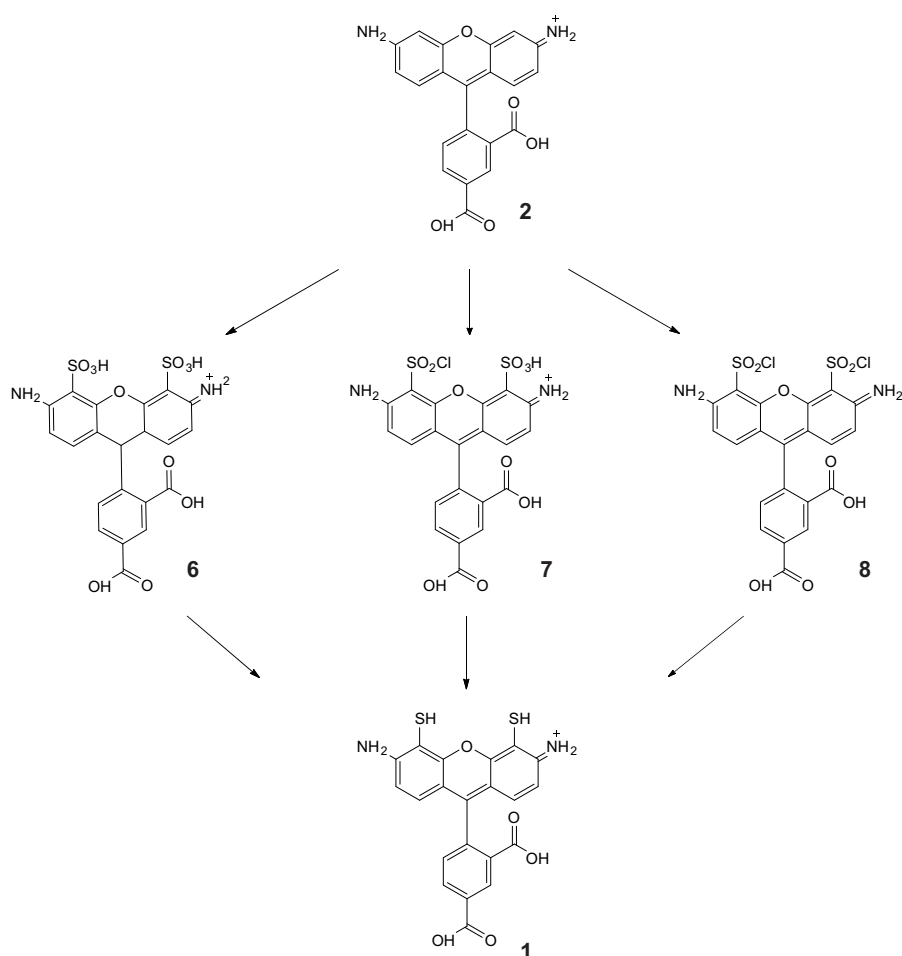


Abbildung 5.1: Synthesewege des thiolierten Rhodamins 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**1**). Ausgangssubstanz ist 5,6-Carboxyrhodamin (**2**).

5.1.1 Synthese des thiolierten Rhodamins 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1) durch Reduktion mit komplexen Hydriden

Als Ausgangsverbindung wurde 5,6-Carboxyrhodamin (2) nach der von Harris im Jahr 2005 vorgestellten Methode synthetisiert.^[97] 3-Aminophenol (9) wird mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäureanhydrid (10) unter Zusatz von katalytischen Mengen 96%iger Schwefelsäure umgesetzt (Abbildung 5.2). Das Produkt entsteht durch zwei elektrophile aromatische Substitutionen und zwei Kondensationen. Diese Art des Ansatzes lieferte jedoch viele Nebenprodukte und die Zielverbindung konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung mit 66% Ausbeute als ein Isomerengemisch erhalten werden.

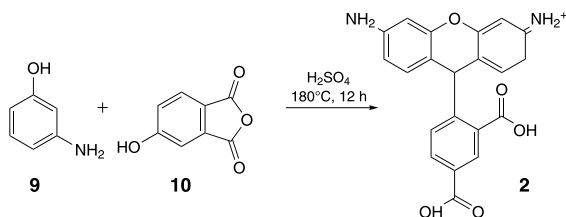


Abbildung 5.2: Synthese der 4-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (2).

Ausgehend von 5,6-Carboxyrhodamin (2) wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (6) hergestellt. Nach der Synthesestrategie von Haugland wird dazu 2 mit rauchender Schwefelsäure umgesetzt (Abbildung 5.3).^[98] Die Umsetzung lieferte viele Nebenprodukte, sodass für die Isolierung von 6 eine säulenchromatographische Reinigungsmethode höherer Effizienz entwickelt werden musste. Dabei erwies sich Kieselgel als ein ungeeignetes Trennmateriale aufgrund der guten Löslichkeit des Kieselgels in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Wasser. Die Isolierung von 6 wurde mit einem Lösungslaufmittelgemisch aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 12:1 durchgeführt. Das gewünschte Produkt 6 lag jedoch als Gemisch mit Kieselgel vor. Durch Aufschlännen der Kieselgel-Farbstoff-Mischung in Methanol konnte der Farbstoff zum Teil vom Kieselgel getrennt werden. Der prozentuale Anteil des Kieselgels in der Probe wurde nicht genau bestimmt.

Eigene Vorarbeiten zeigen, dass 6 (Alexa 488) mittels einer HPLC-Sephadex LH-20 Säule und einer 1%igen wässrigen Triethylamin-Lösung in Wasser abgetrennt werden kann. Die beiden Farbstoff-Isomere können mit Hilfe einer Supelco-RP-Säule in 0.1% TFA in Wasser bzw. Acetonitril getrennt werden. Entsprechende Anlagen waren im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht verfügbar. Aus diesem Grund wurde die Synthesestrategie abgeändert, wie im Kapitel 5.1.2 beschrieben.

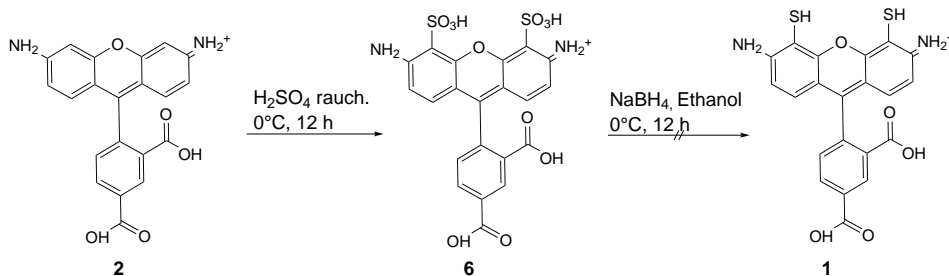


Abbildung 5.3: Synthese von 4-(3,6-Diamino-4-sulfonylchloride-5-sulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (1) über Alexa 488 (6) als Zwischenstufe, ausgehend von (2).

Sulfonsäuren sollten mit komplexen Hydriden wie Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) oder Natriumborhydrid (NaBH_4) zu den entsprechenden Thiolen reduziert werden können. Die Umsetzung von **6** mit Natriumborhydrid in Ethanol lieferte allerdings nicht das gewünschte Produkt. Ebenso konnte der Ansatz mit Lithiumaluminiumhydrid nach Rosencrantz^[99] oder Grunwald^[100] nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Dies kann verschiedene Gründe haben. Die Hydroxygruppe der Sulfonsäure ist eine schlechte Abgangsgruppe. Außerdem kann das angreifende Nucleophil (Reduktionsmittel) durch die starke Sulfonsäure (Protonendonor) protoniert werden. Das damit negativ geladene Sulfonatanion schützt das Schwefelatom vor den nuclephilen Angriffen. Die Verbindung des Farbstoffes mit dem Kieselgel erschwerte die Umsetzung ebenso.

5.1.2 Synthese von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**1**) durch Triphenylphosphin/Iod Reduktion

Die Synthese des thiolierten Rhodamins **1** infolge einer Triphenylphosphin/Iod Reduktion war erfolgreich (Abbildung 5.4). Zuerst wurde die Umsetzung von **2** in die Zwischenstufe **8** ausprobiert, wie von Mao 2013^[101] beschrieben. Die Methode erwies sich allerdings für die Isolierung von **8** als ungeeignet. Durch Zugabe von Chlorsulfonsäure (HO_3Cl) und rauchender Schwefelsäure ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_7$) im Überschuss wurde **7** mit einer Ausbeute bis zu 40% synthetisiert. Wegen der erhöhten Reaktivität wurde **7** ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

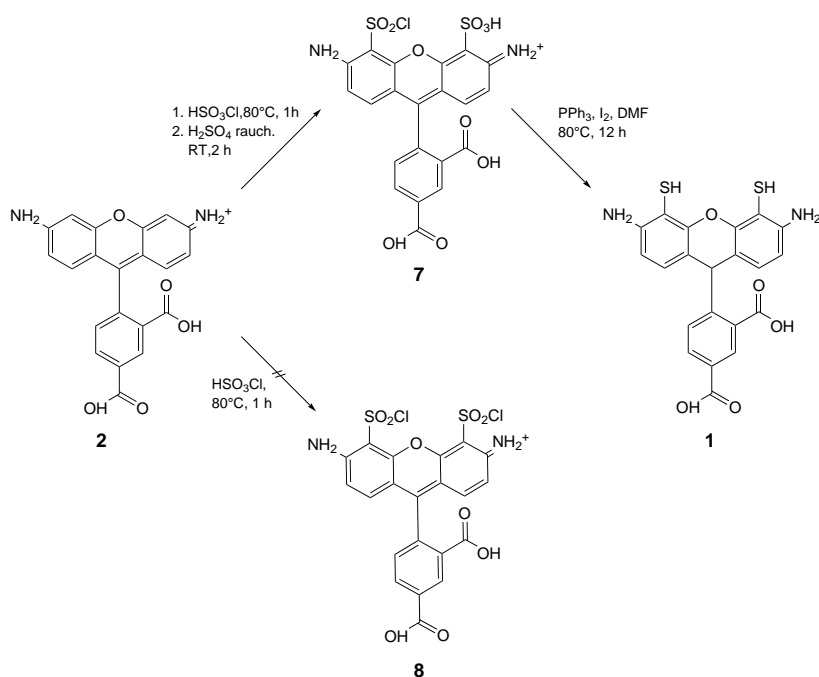


Abbildung 5.4: Herstellungsschema von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**1**) mittels Triphenylphosphin/Iod Reduktion. Der Syntheseweg über **8** war nicht möglich. Dafür war der synthetischer Weg über die Zwischenstufe **7** erfolgreich.

Die Verwendung der Triphenylphosphin/Iod Reduktionsreaktion eignet sich besonders gut für die Herstellung von **1**, da dieses System für Sulfonsäuren und für Sulfonylchloride anwendbar ist. Zur Herstellung von **1** wurden Triphenylphosphin im Überschuss und Iod in katalytischen Mengen zu **7** zugegeben. **1** konnte säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Ausbeute von 38% erhal-

ten werden. Ein möglicher Reaktionsmechanismus zur Reduktion der Sulfonsäuregruppe durch Triphenylphosphin/Iod wurde von Oae und Togo 1983 vorgestellt.^[102] Dabei wird zuerst Iodotriphenylphosphoniumiodid gebildet, welches die Sulfonsäuregruppe deprotonieren kann. Der gleiche Mechanismus wird für die Reduktion von Sulfonchlorid vermutet.^[102]

5.1.3 Synthese von Rhodamin-Derivaten mit thiolierten Ethylen-Abstandshaltern

Rhodamine können mit Cysteamin sowohl an der Carboxylgruppe als auch an der Sulfonsäuregruppe reagieren. Dadurch entstehen Rhodamin-Thioethanolamide oder Rhodamin-Thioethanol-sulfoamide mit einem goldoberflächenaffinen C_2H_4 -Abstandshalter. Durch diese Modifizierung wird der Abstand zwischen dem Chromophor und der Thiolgruppe, welche als oberflächenhaftende Gruppe für die Adsorption auf Metalloberflächen fungiert, variiert. Dies ermöglicht die Untersuchung der abstandsabhängigen SERS-Signalintensität der Raman-Reporter. Abbildung 5.5 zeigt eine Übersicht der synthetisierten Thioethanol-Rhodamin-Raman-Farbstoffe. **4** kann auch als Brückenmolekül für die Assemblierung von zwei Nanopartikeln eingesetzt werden. Die über ein Raman-aktives Molekül verbrückten Nanopartikel-Dimere können als SERS-Markierungspartikel verwendet werden.

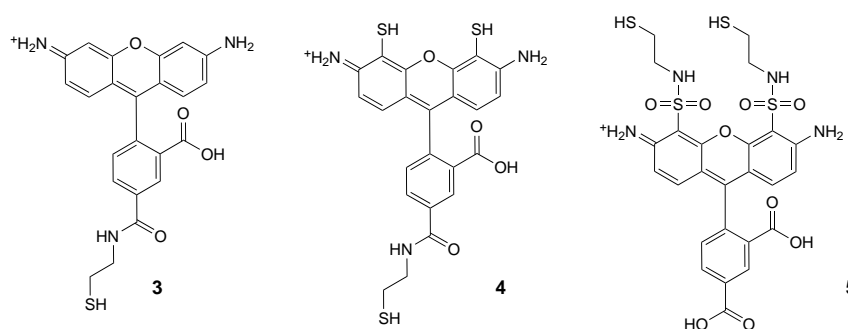


Abbildung 5.5: Übersicht von synthetisierten Cysteamin-modifizierten Rhodamin-Derivaten.

Für die Einführung des thiolierten Abstandshalters (Cysteamin) am Chromophor wurden mehrere Ansätze ausprobiert. Zunächst wurde Alexa 488 (**6**) mit Triphosgen unter Zusatz einer Base umgesetzt. Anschließend wurde zum Ansatz Cysteamin hinzugegeben. Diese Methode lieferte nicht das gewünschte Produkt **5** (Abbildung 5.6). Die Umsetzung von **8** mit Cysteamin führte ebenso nicht zu **5**. Zur Aktivierung von Sulfonsäuren mittels Triphosgen sind einige Ansätze bekannt. So werden je nach Art des Eduktes Reaktionszeit und Reaktionsbedingungen variiert. In dieser Arbeit wurde diese Synthesemethode nicht weiter ausgearbeitet.

5 Ergebnisse und Diskussion

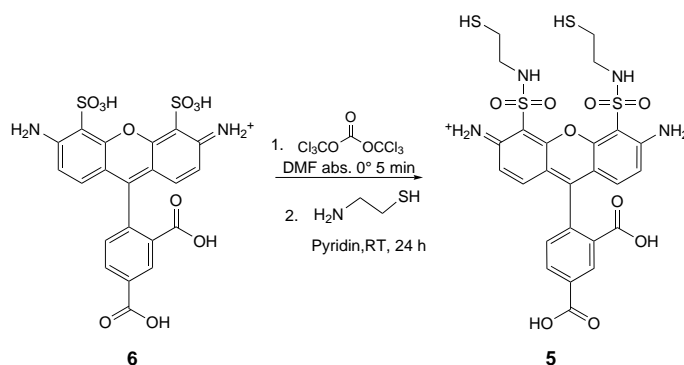


Abbildung 5.6: Synthese von 4-(3,6-Diamino-4,5-bis[(2-sulfanylethyl)sulfamoyl]-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (**5**).

Zur Synthese von 2-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)-5-[2-sulfanylethyl]carbamoyl]benzoesäure (**3**) wird 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) am unteren Phenylring durch Cysteamin modifiziert. Die Aktivierung der Carboxyl-Gruppe erfolgte nach der Steglich-Methode über Carbodiimid/DMAP-Aktivierung (Abbildung 5.7).^[103]

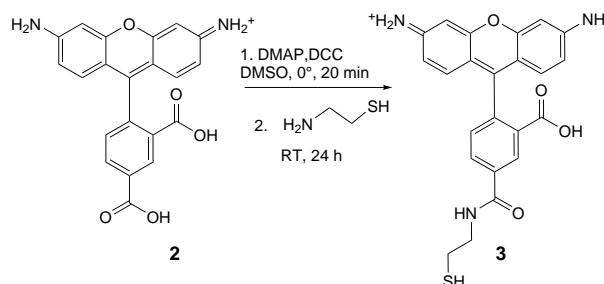


Abbildung 5.7: Synthese von 2-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)-5-[2-sulfanylethyl]carbamoyl]benzoesäure (**3**).

In dieser Arbeit wurden sowohl Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und auch Diisopropylcarbodiimid (DIC) verwendet. Laut Literatur liefert die Aktivierung mit DIC bessere Ausbeuten.^[104] Jedoch ist der entstehende Diisopropylharnstoff in organischen Lösungsmitteln löslich.^[104] Eine säulenchromatographische Reinigung des Reaktionsansatzes ist somit erforderlich, war aber nicht ausreichend. Der Dicyclohexylharnstoff entsteht während der Reaktion mit DCC. Eine Fällung in Aceton und anschließende säulenchromatographische Reinigung mit Kieselgel ermöglichte eine ausreichende, aber nicht vollständige, Reinheit von **3** für weitergehende Experimente.

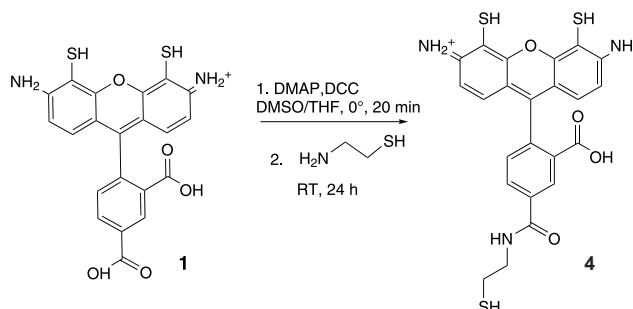


Abbildung 5.8: Synthese von 6-Amino-9-(2-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)carbamoyl)phenyl)-4,5-dimercapto-3H-xanthen-3-iminium (**4**).

Analog verhielt es sich mit der Synthese des thiolierten Rhodamins 6-Amino-9-(2-carboxy-4-((2-

mercaptoethyl)-carbamoyl)phenyl)-4,5-dimercapto-3H-xanthen-3-iminium (**4**) (Abbildung 5.8).

5.2 Raman-spektroskopische Untersuchung von adsorbierten aromatischen Thiolen und Aminen auf Metallkolloiden

Um die Interaktion zwischen einem Raman-Reporter und einer Gold- oder Silberoberfläche zu charakterisieren, werden oft Normalmoden im Bereich zwischen 200 und 350 cm^{-1} mittels oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS) untersucht. Banden in diesem Bereich werden den Schwingungen zwischen Molekül und Metalloberfläche zugeordnet.^[105] Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Raman-aktive Moleküle mit AuNP (60 nm, PVP-stabilisiert) und AgNP (70 nm, Citrat-stabilisiert) inkubiert und in einer kolloidalen Suspension in einer Ethanol/Wasser-Mischung (2:1) mittels SERS untersucht.

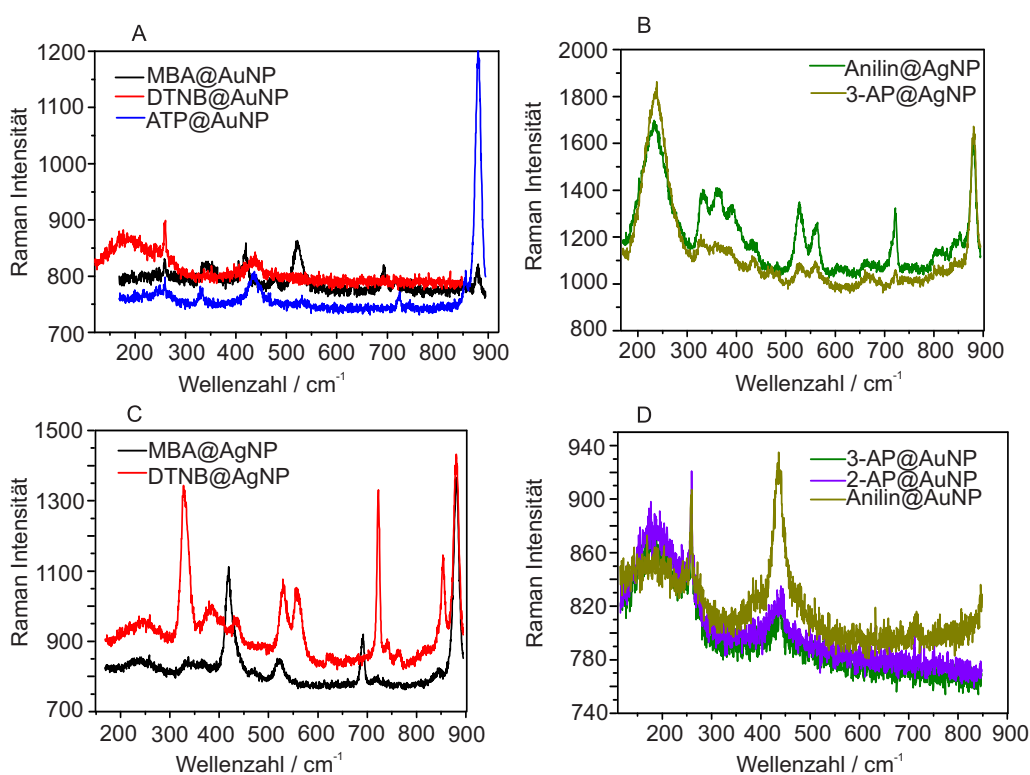


Abbildung 5.9: SERS-Spektren der untersuchten Substanzen. A: 4-MBA@AuNP (schwarze Linie), DTNB@AuNP (rote Linie) und ATP@AuNP (blaue Linie); B: Anilin@AgNP (grüne Linie), 3-AP@AgNP (olivgrüne Linie); C: 4-MBA@AgNP (schwarze Linie), DTNB@AgNP (rote Linie); D: 3-AP@AuNP (olivgrüne Linie), 2-AP@AuNP (violette Linie), Anilin@AuNP (grüne Linie). Es wurden PVP-stabilisierte AuNP (60 nm) und Citrat-stabilisierte AgNP (70 nm) verwendet. Spektrale Auflösung 1800 g/mm , Integrationszeit 10 s, Leistung des Lasers 12 mW, HeNe-Laser 632.8 nm.

Für die PVP-stabilisierten AuNP (60 nm) konnten Raman-Schwingungsbanden von PVP-Molekülen, die auf der Nanopartikeloberfläche adsorbiert sind, gemessen werden. Bei der Adsorption von 4-Mercaptobenzoessäure (MBA) oder 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoessäure (DTNB) auf der Oberfläche von AuNP, beobachtet man keine Banden des PVP mehr. In Abbildung 5.9 A sind die SERS-Spektren von 4-MBA, DTNB und Aminothiophenol (ATP) dargestellt und es ist eine Bande bei 250 cm^{-1} zu erkennen. Dabei kann es sich um eine verschobene Au-S-Schwingung handeln, da die Au-S-Streckschwingung literaturbekannt bei Wellenzahlwerten von 242 cm^{-1} erscheint.^[106] Die SERS-Aufnahmen von 4-MBA und DTNB mit AgNP zeigen gut erkennbare SERS-Spektren (Abbildung 5.9 C). Die Ag-S-Schwingungsmode, die zwischen 200 und 250 cm^{-1} detektierbar ist, ist nicht erkennbar. Dies deutet auf eine Chemisorption des Raman-Reporters über einen anderen Adsorptionsweg hin.

Hildebrandt und Stockburger adsorbierten Rhodamin 6G auf einem Silber-Kolloid und detektierten eine Schwingungsbande bei 235 cm^{-1} , die der Ag-N-Streckschwingung zugeordnet wurde.^[107] In diesem Wellenzahlbereich können jedoch auch Schwingungsbanden von Ag-O (Oxidation der Metalloberfläche) oder Ag-Cl detektiert werden.^[108] Um Ag-N- oder Au-N-Schwingungsmode nachzuweisen, wurden Anilin, 3-Aminophenol (3-AP) und 2-Aminophenol (2-AP) mit AgNP (70 nm) und AuNP (60 nm) inkubiert und mittels SERS untersucht. Die dargestellten Spektren in der Abbildung 5.9 B weisen eine breite Raman-Bande bei 240 cm^{-1} auf. Die Bande kann der Ag-N- oder der Ag-O-Schwingung in Citrat-stabilsierter Suspension zugeordnet werden. Die starke Signalintensität dieser Schwingungsmode wird auf die Aggregation des Kolloids zurückgeführt. Die SERS-Spektren von 3-AP, 2-AP und Anilin, die sich auf der Oberfläche von 60 nm großen AuNP befinden (Abbildung 5.9 D), weisen zwei reproduzierbare Raman-Signale bei 250 und 450 cm^{-1} auf. Mit diesem Experiment wird gezeigt, dass bei nicht-resonanter Anregung (632.8 nm), Detektion und eindeutige Zuordnung von Gold-Schwefel/Stickstoff- oder Silber-Schwefel/Stickstoff-Moden mit Hilfe der SERS-Spektroskopie sich schwierig gestaltet. Eine eindeutige Aussage über das Adsorptionsverhalten eines Raman-Reporters auf Metalloberflächen ist ebenso schwierig.

5.3 Raman-spektroskopische Untersuchung der thiolierten Rhodamine

Zur Bestimmung der Raman-Aktivität der thiolierten Rhodamin-Derivate wurden diese zunächst mit AgNP inkubiert und mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde die Konzentration der Citrat-stabilisierten AgNP (70 nm) konstant gehalten. In Abbildung 5.10 links sind die normierten SERS-Spektren für CRhSH (**1**), CRh (**2**), CRh-Cys (**3**) und CRhSH-Cys (**4**) dargestellt. Alle Spektren weisen Raman-Banden im Bereich zwischen 1200 und 1580 cm^{-1} auf, die den Schwingungen des Xanthenringes zugeordnet werden können. Für CRhSH (**1**) (schwarze Linie) treten weitere Beiträge zwischen 625 , 750 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ -Schwingung, Phenylring) und bei ca. 1020 cm^{-1} (CSH-Schwingung, Xanthenring) auf. Eine ausführliche Bandenzuordnung für **1** und **2** ist im Kapitel 5.4.1 (Tab.1) dargestellt. Die Raman-Bande bei 880 cm^{-1} ist dem Suspensionsmittel Ethanol zuzuordnen, welcher als interner Standard (rote Linie) verwendet wurde. Die Struktur der Raman-Moleküle CRhSH-Cys (**4**) bzw. CRh-Cys (**3**) ermöglicht die Ausbildung von Nanopartikelaggregaten, wie beispielsweise Dimeren, aufgrund des Vorliegens von Thiolgruppen am Xanthen- und am Phenylring.

In Abbildung 5.10 rechts sind die entsprechenden, normierten Extinktionsspektren der Silber-

Nanopartikel nach der Inkubation mit dem jeweiligen Raman-Reporter dargestellt. Die Extinktionsspektren der AgNP mit **4** (rote Linie) und **3** (blaue Linie) haben jeweils zwei Plasmonbanden bei $\lambda_{max} = 440$ nm und $\lambda_{max} = 600$ nm. Dies bestätigt das Vorliegen von Nanopartikelaggregaten. Hierdurch lassen sich die Beiträge zwischen 500 und 750 cm^{-1} in den SERS-Spektren (blaue und grüne Linie) erklären. Diese Raman-Banden (C=C-Schwingung, Phenylring) werden durch die Anbindung des Phenylrings über das Cysteamin an die AgNP-Oberfläche besser verstärkt. Die schwache Schulter im Extinktionsspektrum (schwarze Linie) der mit **1** inkubierten AgNP deutet auf eine minimale Aggregation der Nanopartikel hin.

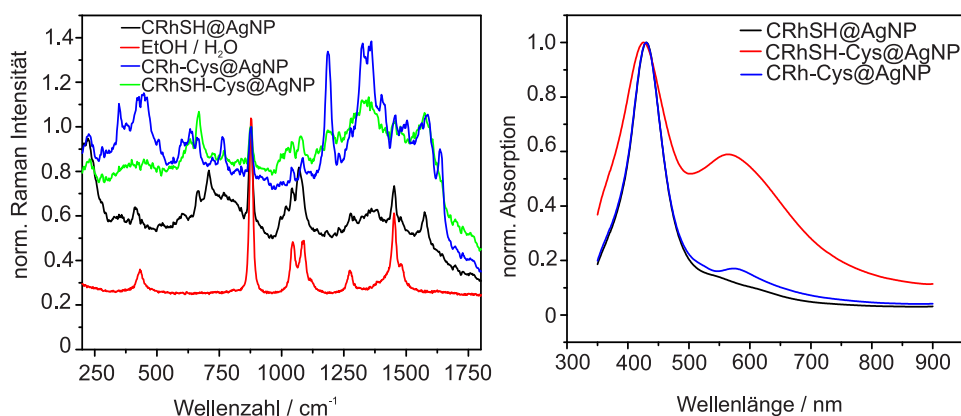


Abbildung 5.10: Links: SERS-Spektren von CRhSH@AgNP (schwarz), CRhSH-Cys@AgNP (grün) und CRh-Cys@AgNP (blau). Normierung auf die Raman-Bande von Ethanol bei ca. 880 cm^{-1} (rot). Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 10 mW. Integrationszeit 10 s mit drei Koadditionen. Die Spektren sind ohne Basislinienkorrektur dargestellt. Rechts: Extinktionsspektren der AgNP nach der Inkubation mit den jeweiligen Raman-Reportern, CRhSH@AgNP (schwarz), CRhSH-Cys@AgNP (rot) und CRh-Cys@AgNP (blau).

Insgesamt fällt auf, dass die Spektren zwischen 1000 und 1600 cm^{-1} keine schmalen Banden besitzen. Dies kann mit der Orientierung der Raman-Reporter in den *hot spots* der Aggregate zusammenhängen. Da Monomere, Dimere und größere Aggregate in Suspension vorliegen, werden die Raman-Signale unterschiedlich verstärkt. Außerdem können die verwendeten Raman-Reporter mit der Nanopartikeloberfläche über die Amino- und Thiolgruppen oder über die π -Elektronen der Aromaten (Xanthen-Einheit) interagieren. Daraus folgt, dass während der Messung viele verschiedene Beiträge gleichzeitig detektiert werden. Somit kann die Form der experimentell erhaltenen Spektren auf das Überlagern vieler Beiträge zurückgeführt werden.

Die Adsorption des thiolierten Rhodamins (**1**) wurde ebenso mit Gold-Nanopartikeln erprobt. Es wurden Citrat-stabilisierte AuNP (80 nm) und PVP-stabilisierte AuNP (60 nm) mit **1** inkubiert. Die ethanolische Suspension wurde mit einer Laserleistung von 10 mW (632.8 nm) bestrahlt, und Raman-Spektren mit einer Integrationszeit von 10 Sekunden aufgenommen. Eine von Probe zu Probe wiederkehrende inhomogene SERS-Signalintensität wurde beobachtet. Dies wurde auf den unterschiedlichen Aggregationsgrad der Nanopartikel zurückgeführt, da AuNP-Monomere keine ausreichend hohe plasmonische Verstärkung und somit nur schwache SERS-Aktivität aufweisen.^[88] Die Experimente weisen die Raman-Aktivität der synthetisierten Raman-Reporter (**1**, **3** und **4**) nach. Ein quantitativer Vergleich der SERS-Signalintensitäten konnte jedoch nicht durchgeführt werden.

5.4 Charakterisierung von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1)

Der Farbstoff (4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure) (**1**) eignet sich besonders gut für den Einsatz als Raman-Reporter in SERS-Anwendungen. Die Struktur hat einen großen Raman-Streuquerschnitt, sodass ein besonders starkes SERS-Signal erwartet wird. Durch die gezielte Einführung der Thiolgruppen direkt am Chromophor soll ein möglichst kleiner Abstand zwischen dem Raman-Farbstoff und der Metalloberfläche zur besseren Verstärkung des Signals geschaffen werden. Des Weiteren ermöglichen die Carbonsäurereste eine weitere Funktionalisierung (Biokonjugation, Verkapselung) des SERS-Markerpartikels. Deswegen wurde der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung des Raman-Reporters CRhSH (**1**) gelegt. In den folgenden Kapiteln werden die erhaltenen Ergebnisse mit diesem neuen bithiolierten Rhodamin (**1**) beschrieben.

5.4.1 Computer-chemische Berechnungen

In diesem Abschnitt werden die DFT-simulierten Schwingungsspektren für **1** und **2** vorgestellt. In Abbildung 5.11 sind die charakteristischen Fingerprint-Regionen für beide Raman-Farbstoffe dargestellt.

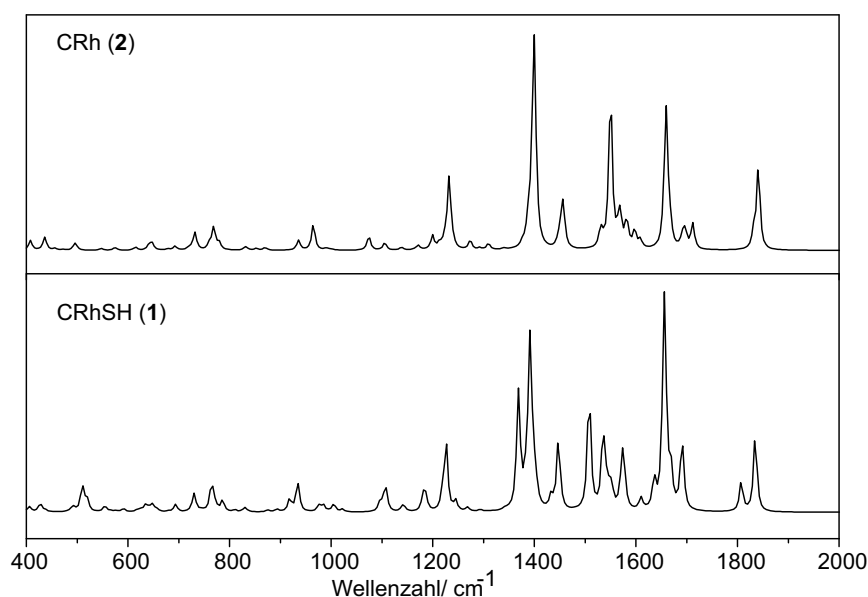


Abbildung 5.11: DFT berechnete Raman-Spektren von 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) und von dem thiolierten Rhodamin (**1**). Theorieniveau: B3LYP/6-311G++ (d,p), Skalierungsfaktor 0.97.

Die wichtigsten Regionen der Raman-Spektren befinden sich im Bereich zwischen 900-1100 cm^{-1} und 1200-1700 cm^{-1} . Der zweite Bereich umfasst aufgrund der starken elektronischen Polarisierbarkeit intensive Raman-Banden der Xanthen-Einheit. Genauer, werden diese Bandenpositionen den Xanthenring-Streckschwingungs-, Deformationsschwingungs- und C-N-Streckschwingungsmoden zugeordnet (Tab. 5.1). Es fällt auf, dass die Normalmoden von **1** bei kleineren Wellenzahlwerten liegen als bei **2**. Dies wird aufgrund des Masseneffektes hervorgerufen. Im Bereich zwischen 900-1100 cm^{-1} werden weniger intensive Raman-Banden vorausberechnet. Diese Normalmoden werden den C=C-Biegeschwingung und C-O-C-Streckschwingung der Xanthen-Einheit

des thiolierten Rhodamins (**1**) zugeordnet. Die Schwingungsbanden bei 918 cm^{-1} und 1020 cm^{-1} umfassen die Schwefelatome (Tab. 5.1), sodass diese Banden bei der Untersuchung der Adsorption von **1** auf Metalloberflächen näher betrachtet werden. Obwohl diese Banden in den konventionellen Raman-Spektren nur wenig intensiv sind, kann die Intensität dieser Banden durch den oberflächenverstärkten Effekt erhöht werden. In der Tabelle sind die Normalmoden von **1** und **2** zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Raman-Bandenordnung für thioliertes Rhodamin (1) und 5,6-Carboxyrhodamin (2) (B3LYP/6-311G++(d,p), Skalierungsfaktor 0.97). ν_s symmetrische Streckschwingung, ν_a antisymmetrische Streckschwingung, δ_{def} Deformationsschwingung, δ_{sc} Scherschwingung, ρ Schaukelschwingung.

$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ CRhSH (1)	Zuordnung für CRhSH (1)	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ CRh (2)	Zuordnung für CRh (2)
730	δ_{def} (CCC) Phenyl	732	δ_{def} (CC) Phenyl
768	δ_{def} (CCC)Ph + δ_{def} (CSH) + ν_s (CC) Xa	769	δ_{def} (COC) Xa
918, 934	δ_{def} (SH)	936	δ_{def} (CCC) Xa
1022	ν_a (COC) Xa + ν_a (CC) Xa + δ_{sc} (HSC) Xa + (NH) ρ	964	δ_{def} (CC) Phenyl + δ_{def} (CCC) Xa
1097	ν_s (CC) Phenyl + δ_{def} (CCC) Xa	1199	ν_s (CCO) Phenyl
1107	ν_s (CC) Xa + (NH) ρ	1232	(CC, Ringatmung) Phenyl + ν_a (COC) Xa
1226	(CC, Ringatmung) Phenyl	1340	ν_a (CC) Phenyl
1343	ν_a (CC) Phenyl	1395	ν_s (CC) Xa
1369	δ_{def} (CC) Xa + ν_a (CC) Xa	1456	ν_a (CC) Xa + δ_{def} (CC) Xa
1392	ν_s (CC) Xa	1550	ν_s (CC) Xa
1446	ν_s (CC) Phenyl	1569	ν_s (CC) Xa
1447	ν_a (CC) Xa	1581	ν_a (CC) Xa
1508	δ_{def} (CC) Xa	1659	ν_s (CC) Xa
1535	ν_a (CC) Phenyl	1697	δ_{def} (NH) Xa
1576	δ_{def} (CC) Xa	1712	ν_s (CC) Xa
1636	δ_{def} (NH) Xa + ν_s (CC) Xa	1841	ν_s (CO) Carboxy
1657	ν_s (CC) Xa		
1690	ν_s (CC) Xa		
1835	ν_s (CO) Carboxy		

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DFT-Berechnungen für CRh (**2**) und CRhSH (**1**) zur Identifizierung der Atome, die an der Bindung zur Metalloberfläche beteiligt sein werden, durchgeführt. Die Abbildung 5.12 präsentiert die optimierten Strukturen zusammen mit den molekularen elektrostatischen Potentialen (MEP) der Rhodamine **1** und **2**.

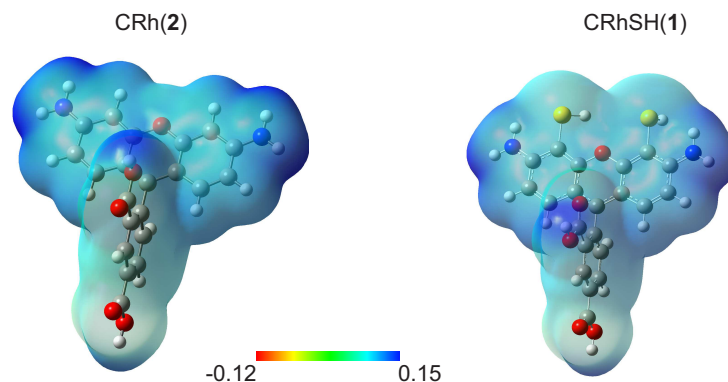


Abbildung 5.12: Molekulare elektrostatische Potentiale von 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) (links) und von dem thiolierter Rhodamin (**1**) (rechts). Methode für die Optimierung der Molekülstrukturen: DFT, B3LYP/6-311G+(d,p).

Die Hauptebene der Xanthen-Einheit ist planar und der Phenylring ist senkrecht zu dieser Ebene orientiert. Die Amino- und Thiolgruppen liegen in der Ebene mit dem Xanthengerüst. Die Falschfarben-Kartierung zeigt Regionen im Molekül mit negativen (rot) und positiven (blau) Potentialen. Die hellblauen Regionen auf der Falschfarben-Karte des MEPs von **2** umfassen die Stickstoffe (Amino-Gruppe) und den Sauerstoff der Xanthenringeinheit. Deshalb wird die Anbindung von **2** an Metalloberflächen über die freien Elektronenpaare des Stickstoffes oder des Sauerstoffes erwartet. Die Einführung der Thiolgruppen an Xanthenringen führt zu einer Ausbreitung des negativen elektrostatischen Potentials (Abbildung 5.12, CRhSH (**1**)). Daher wird die Bindung von **1** an eine nackte Gold-Oberfläche über die freien Elektronenpaare der Schwefelatome vorausgesetzt. Die Adsorptionsseite des thiolierter Rhodamins (**1**) an eine Metalloberfläche wird im Folgenden mittels Schwingungsspektroskopie, insbesondere mittels SERS untersucht.

5.4.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

In diesem Kapitel werden die optischen Eigenschaften von **1** im Vergleich zu **2** und Rhodamin 6G vorgestellt. In der Abbildung 5.13 sind die experimentell erhaltenen Absorptionsspektren der Rhodamin-Derivate gezeigt.

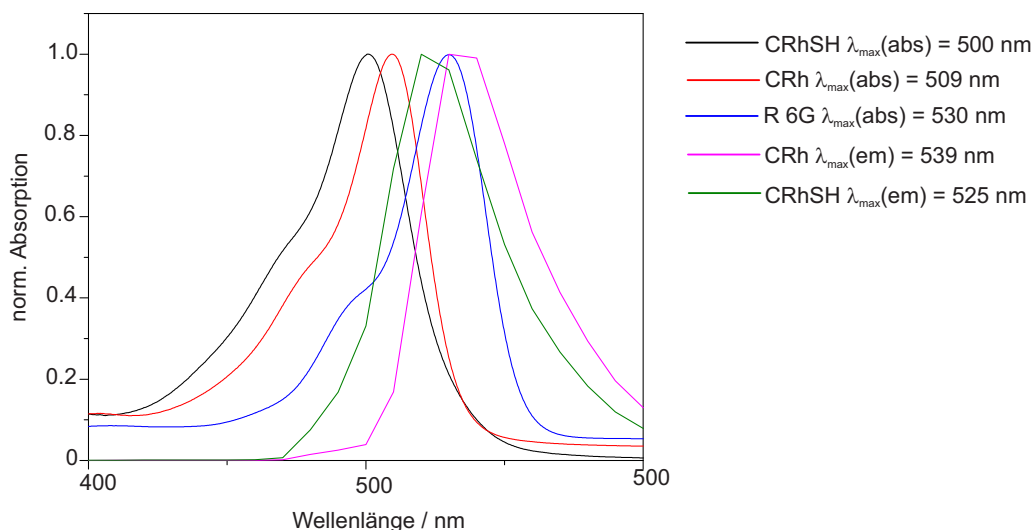


Abbildung 5.13: Absorptionsspektren von CRh (**2**), CRhSH (**1**) und Rhodamin 6G (1 mM Lösung in Ethanol).

Die Amino- und Amidgruppen wirken als Auxochrome und verstärken den bathochromen Effekt (Rotverschiebung), während die bei CRhSH (**1**) eingeführten Thiolgruppen zu einer hypsochromen Verschiebung (Blauverschiebung) des Absorptionsmaximums führen. Der molare Extinktionskoeffizient und die relative Fluoreszenzintensität von CRhSH (**1**) unterscheiden sich um Faktor drei und CRh (**2**) scheint der hellste Farbstoff zu sein. Dass **2** und Rhodamin 6G heller als der thiolierte Farbstoff CRhSH (**1**) sind, kann auf den +M-Effekt der NH_2 - und NHR-Substituenten zurückgeführt werden.

Die gemessene Fluoreszenzlebensdauer (Tab. 5.2) der drei Farbstoffe beträgt ca. 4 ns und ist mit den bekannten Literaturwerten vergleichbar. Kristoffersen zeigte für Rhodamin B bei einer 1 mM wässrigen Lösung eine Abschwächung der Fluoreszenzlebensdauer.^[109] Ebenso wurde Fluoreszenz-Quenching für Rhodamin 6G bei einer Konzentration von 100 mM detektiert.^[110] In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Konzentration mittels FLIM-Experimenten (Verdünnungsreihe von 1 mM bis 1 μM) untersucht. Für 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) und Rhodamin 6G wurde Fluoreszenzlöschung /Quenching für den Konzentrationsbereich zwischen 10^{-3} und 10^{-4} M beobachtet. Wider Erwarten wurde gar kein Quenching für **1** detektiert.

Tabelle 5.2: Physikalisch-chemische Eigenschaften von CRhSH (**1**), CRh (**2**) und Rhodamin 6G.

Farbstoff	τ [ns]	ε [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]	Rel.Int RFU	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]
CRhSH (1)	3.81	5000	857	498	525
CRh (2)	3.81	16000	3730	508	539
R 6G	4.02	10900	2300	528	565

5.4.3 SERS-Experimente mit Gold-Nanosternen

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 5.3 zeigten, dass sphärische AuNP oder AgNP wegen des geringen Verstärkungsfaktors für quantitative SERS-Experimente nicht geeignet sind. Deswegen wurden Au-Nanosterne (AuNS) zunächst in kolloidaler Suspension und anschließend auf Einzelpartikelniveau für die Herstellung von SERS-Markern mit dem neuen bithiolierten Rhodamin (**1**) verwendet.

Die Abbildung 5.14 präsentiert die optischen Eigenschaften der verwendeten AuNS, die nach dem Protokoll von König *et.al.* synthetisiert wurden.^[111]

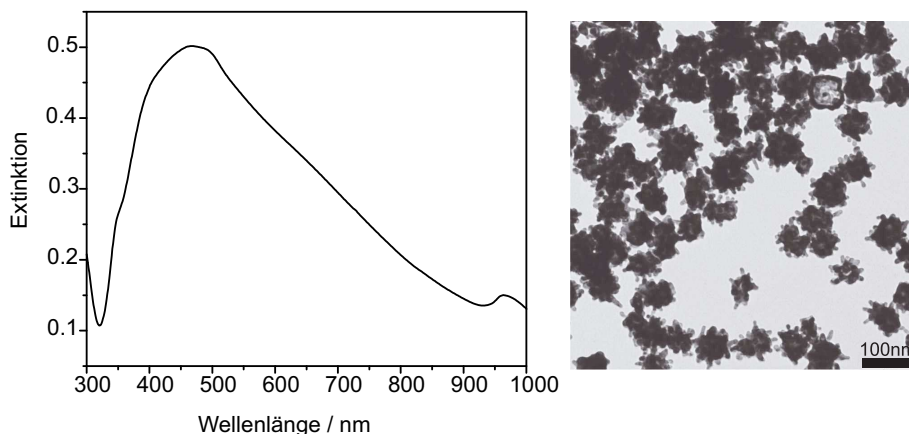


Abbildung 5.14: Gold-Nanosterne: links Extinktionsspektrum $\lambda_{max} = 490$ nm, rechts: TEM-Aufnahmen von Au-Nanosterne mit einer Größe von ca. 70 nm.

Die Plasmonbande der AuNS liegt bei $\lambda_{max} = 490$ nm und die Größe der Nanopartikel liegt zwischen 60-70 nm. Diese AuNS eignen sich aufgrund der plasmonischen Verstärkung für die SERS-Experimente mit der Laser-Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 632.8$ nm (HeNe). Obwohl für beide Experimente die gleiche Nanopartikelkonzentration gewählt wurden, sind Unterschiede in der Qualität der Spektren im Bezug auf Signal-zu-Rauschen-Verhältnis festzustellen. Dabei kann das an der unterschiedlichen Oberflächenaffinität/-bedeckung der Rhodamine liegen. Ebenso kann der Aggregationszustand des Kolloids nach der Inkubation mit den Farbstoffen das Signal beeinflussen. Um eine Aussage über die Orientierung von **1** auf der Nanopartikeloberfläche zu treffen, sollten verstärkte Raman-Banden in den experimentell erhaltenen Spektren (Abbildung 5.15) identifiziert werden.

Im Spektrum von **1** sind zwei relativ starke Raman-Banden bei ca. 940 cm^{-1} und 1020 cm^{-1} deutlich erkennbar. Diese entsprechen den Normalmoden, die Schwefelatome enthalten, wie im Abschnitt 5.4.3 beschrieben. Für 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) sind diese Moden in dem gemessenen SERS-Spektrum und in dem DFT berechneten Spektrum nicht vorhanden. Diese Beobachtungen führen zu der Aussage, dass **1** über die Thiolgruppen auf der Metalloberfläche der Au-Nanosterne adsorbiert. Bei dem Spektrum für 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) wurden zwei signifikante Moden bei 1200 cm^{-1} und 1360 cm^{-1} detektiert. Diese werden den C=C-Streckschwingung der Xanthen-Einheit, C-N-Streckschwingung und NH-Schaukelschwingung zugeordnet (Tab. 5.1). Somit wird eine Adsorption von **2** über die Xanthenringe und über Aminogruppen auf der Metalloberfläche der AuNS angenommen. Die Arbeit von Sarkar bestätigt diese Annahmen.^[112]

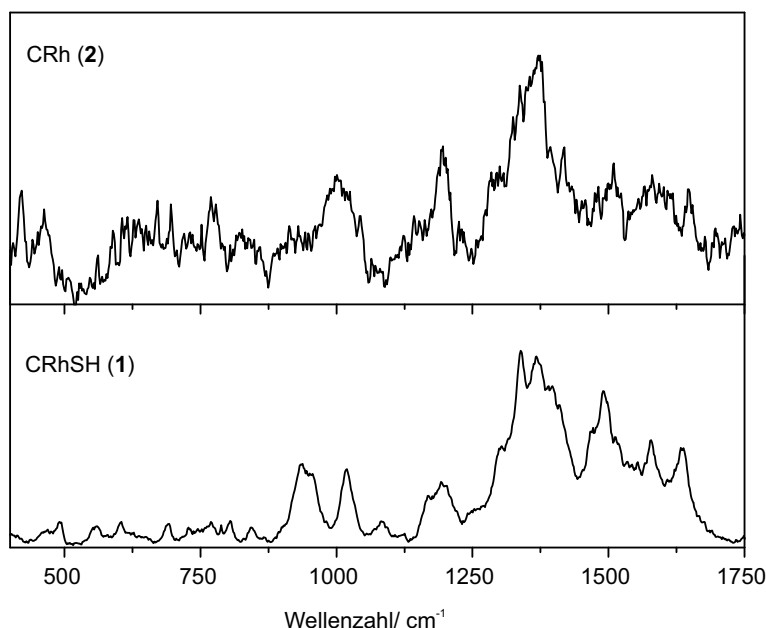


Abbildung 5.15: SERS-Spektren von CRhSH (1) und CRh (2) auf Au-Nanosternen. Integrationszeit von 10 s, Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 10 mW.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die quantitative Untersuchung der Raman-Intensität der synthetisierten Raman-Reportermoleküle. Dazu sollen möglichst monodisperse und plasmonisch aktive Nanopartikel verwendet werden, die nach der Inkubation mit einem Raman-Reporter keine Aggregation aufweisen. In einem Einzelpartikel-SERS-Experiment wurden die Streuquerschnitte von CRhSH (1) und CRh (2) untersucht. Dazu wurden die AuNS nach der Inkubation mit dem thiolierten Rhodamin (1) 1:100 in Ethanol verdünnt, auf einem Silizium-Substrat immobilisiert und per Punktrasterkartierung (engl. *point-mapping*) am Raman-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 632.8 nm untersucht.

Die Objektträger wurden durch das Abrastern eines $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ für 5,6-Carboxyrhodamin (2) und $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ für das thiolierte Rhodamin (1) mit einer Schrittweite von 500 nm und einer Integrationszeit von 2 s untersucht. Die Abbildung 5.16 C und D zeigt die Falschfarben-Bilder, basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Reporter-Bande bei $1200\ \text{cm}^{-1}$. Die gelben Punkte repräsentieren die hohen SERS-Intensitäten. Die SERS-Spektren von jeweils einem einzelnen Gold-Nanosternen sind in der Abbildung 5.16 A mit 2 und B mit 1 gezeigt. Zur Normierung der Spektren wurde die Silizium-Phononbande bei $520\ \text{cm}^{-1}$ herangezogen. Die Schwingungsbanden des Raman-Farbstoffes CRhSH (1) sind blau und die von CRh (2) rot markiert. Obwohl die Moleküle vergleichbare Streuquerschnitte aufweisen, wurde für 2 ca. doppelt so viel Signal wie für 1 detektiert. Zur Erklärung der Signalverstärkung wurde die Form (Anzahl der Spitzen und die Größe) der Au-Nanosterne mittels REM-Aufnahmen untersucht. In der Abbildung 5.16 E ist die REM-Aufnahme des AuNS mit 2 gezeigt. Die Au-Nanosterne mit 1 konnten auf dem Silizium-Träger mittels REM nicht identifiziert werden. Bei diesem Ansatz wurden Citrat- und PVP-stabilisierte Nanosterne verwendet. Von den Citrat-stabilisierten AuNS zeigte nicht jedes detektierte Nanopartikel SERS-Aktivität. Außerdem wiesen die REM-Aufnahmen Dimere und größere Aggregate nach. Die experimentellen Messungen mit den PVP-stabilisierten AuNS lieferten keine SERS-Spektren. Vermutlich lag das daran, dass die Raman-Reporter auf den AuNS-Oberflächen wegen der PVP-Schicht nicht adsorbierten.

Außerdem wurde in der Arbeitsgruppe Schlücker eine Veränderung der Kristallstruktur von Citrat-

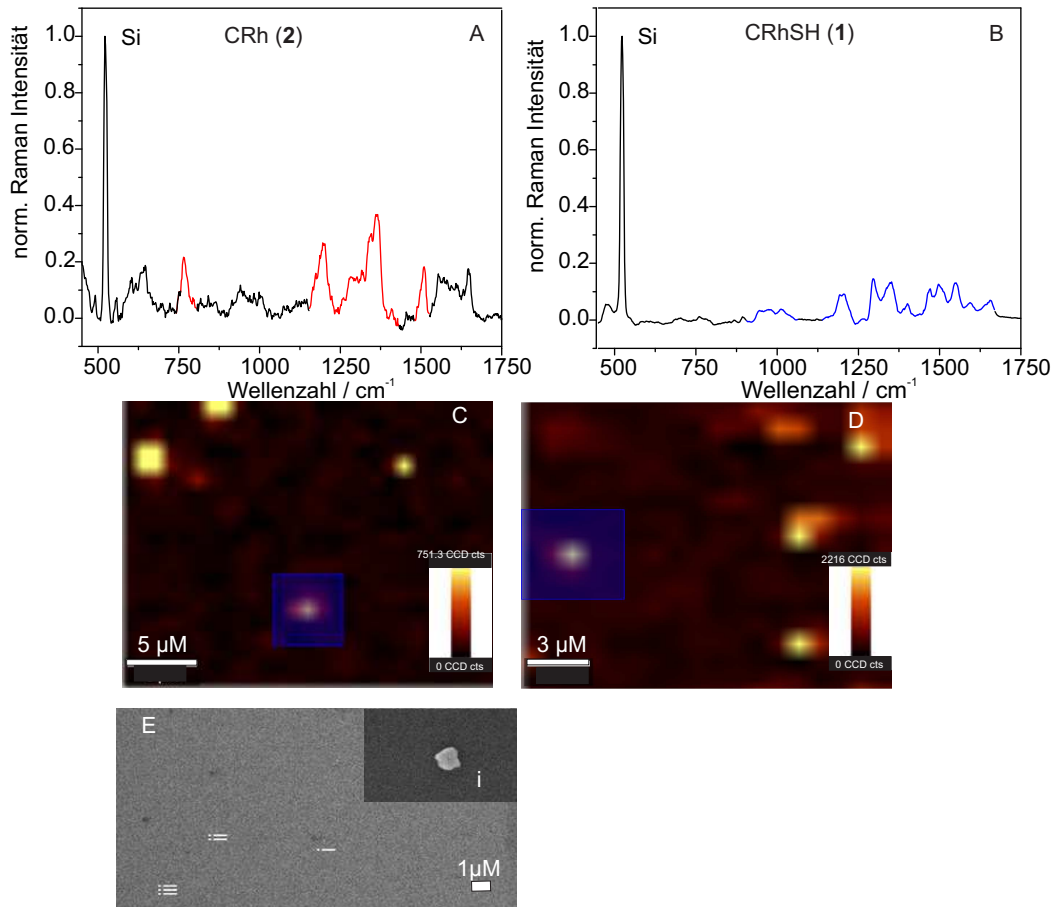


Abbildung 5.16: Einzelpartikel-Experimente mit Au-Nanosternen. A: SERS-Spektrum von CRh (2); B: SERS-Spektrum von CRhSH (1); C und D: Falschfarben-Bilder, basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Reporter-Bande bei 1200 cm^{-1} ; E: REM-Aufnahme für die CRh@AuNS Probe. Die SERS-Spektren wurden auf die Si-Phononbande bei 520 cm^{-1} normiert. Integrationszeit 2 s, Leistung 0.3 mW, Anregungswellenlänge 632.8 nm .

stabilisierten Au-Nanosternen, die eine Woche nach der Synthese auftritt, nachgewiesen. Dabei kann es sich um die Rückbildung der Spitzen handeln, die zu einer Herabsetzung der SERS-Aktivität führt. Die Veränderung der Kristallstruktur von PVP-stabilisierten Au-Nanosternen und die damit verbundene geringe SERS-Aktivität ist nicht auszuschließen. Die ermittelten Signalunterschiede können auf die inhomogene Partikelgröße und Form zurückgeführt werden. Für den Vergleich der SERS-Signalintensitäten sind monodisperse und uniforme Gold-Nanopartikel erforderlich. Außerdem müssen weitere Experimente zur Verbesserung der Stabilität von Au-Nanosternen durchgeführt werden. Die unkontrollierte Aggregation der Nanopartikel kann durch die hydrophile Stabilisierung^[49] oder Verkapselung^[113] der AuNS vermieden werden. Dadurch kann die Anzahl von einzelnen AuNS auf dem Silizium-Substrat für die Durchführung von Einzelpartikel-SERS-Experimenten erhöht werden. Für einen fairen Vergleich der Signalintensitäten muss für die Statistik ein großer Satz an Nanopartikeln vermessen werden.

5.4.4 SERS mit AuNP@Au-Film

Die im Kapitel 5.4.3 vorgestellten Erkenntnisse führten zur Entwicklung von AuNP@Au-Film als SERS-Substrate. Baumberg und Aizpurua verwendeten zur Untersuchung von molekularer Leitfähigkeit Nanopartikel in einer Spiegelgeometrie-Anordnung (*engl. nanoparticle on mirror*).^[95] Für SERS-Messungen wurde eine ähnlicher Weg gegangen. Das Substrat (Abbildung 5.17) wurde wie folgt vorbereitet: a) Ein Glasobjektträger wurde mit einer 100 nm Goldschicht bedampft, b) der Goldfilm wurde dann mit einer 1 mM methanolischen Lösung des jeweiligen Raman-Reporters behandelt, c) die vorbereiteten Goldfilme wurden einer kolloidalen Suspension von super-sphärischen AuNP (51 nm, CTAB-stabilisiert) ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben mittels Raman-Spektroskopie untersucht.

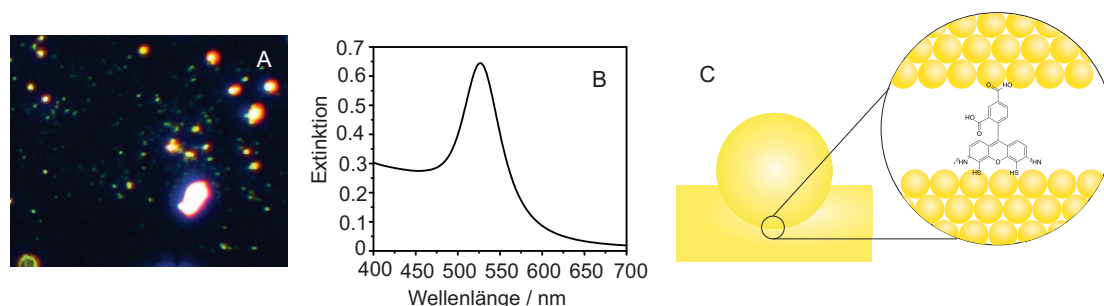


Abbildung 5.17: A: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Au-Film, 10x Objektiv mit NA = 0.25, Integrationszeit 2 s, Leistung 300 μ W. Grüne Punkte AuNP, helle gelbe Punkte Löcher; B: Extinktionsspektrum der super-sphärischen AuNP (CTAB-stabilisiert), λ_{max} = 525 nm; C: Schematische Darstellung des AuNP@Au-Substrates.

In Abbildung 5.17 A ist exemplarisch eine Dunkelfeld-Aufnahme des Gold-Filmes nach der Inkubation mit Raman-Reportern und super-sphärischen AuNP gezeigt. Das Streulicht der Nanopartikel wurde mit einem 10 x Objektiv gesammelt. Die Nanopartikel erscheinen als grüne Punkte. Die Farbe des gestreuten Lichtes ist auf die transversale Plasmonmode der Nanopartikel bei etwa 525 nm zurückzuführen.^[114] Die großen gelben Punkte wurden als Löcher in den Gold-Filmen identifiziert. In Abbildung 5.18 sind die aufgenommenen SERS-Spektren präsentiert.

Für jede Probe wurden drei bis fünf SERS-Spektren an jeweils drei Positionen auf den Substraten aufgenommen. Für alle drei Raman-Reporter wurden reproduzierbare SERS-Spektren aufgenommen. Den Ergebnissen in Abbildung 5.18 kann entnommen werden, dass die Signalintensitäten trotz gleicher experimenteller Bedingungen für **2** um 27 %, für **1** um 46% und für Rhodamin 6G um 42% abweichen. Aufgrund der homogenen Größenverteilung der verwendeten AuNP wird vorausgesetzt, dass sich *hot spots* mit relativen uniformen Abständen zwischen Goldfilm und AuNP oder anderen AuNP selbst ausbilden. Die *hot spots* sind für die Signalverstärkung uniform verantwortlich. Mit Hilfe der in Abbildung 5.17 A gezeigten Dunkelfeld-Aufnahmen ist eine Aussage über die Bedeckung mit Nanopartikeln auf dem Objektträger nicht möglich. Die CTAB-stabilisierten AuNP binden elektrostatisch über die Carbonsäuregruppen der Rhodamine **1** und **2** auf der Goldoberfläche. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Oberflächenbedeckung durch äußere Eingriffe, wie Waschen der Probe, beeinflusst werden wird.

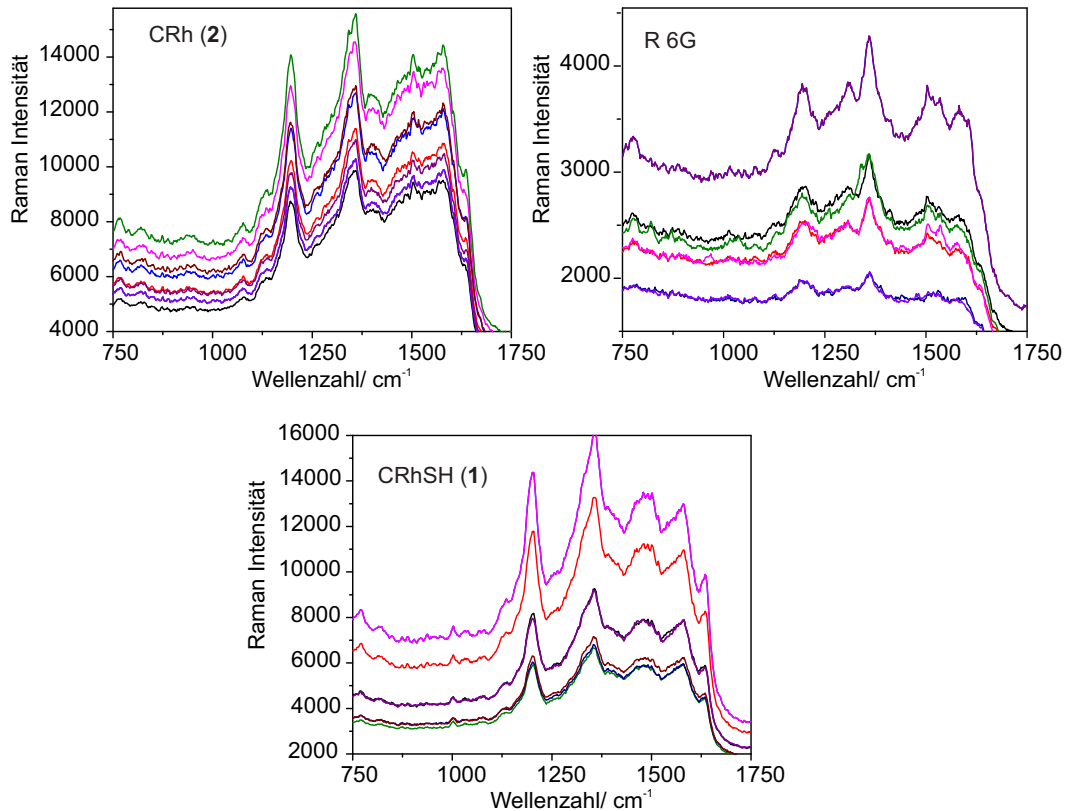


Abbildung 5.18: SERS-Spektren von CRhSH (1), CRh (2) und Rhodamin 6G auf AuNP@Au-Film. Integrationszeit 2 s, Leistung 300 μ W, Anregungswellenlänge 632.8 nm.

Für quantitative SERS-Messungen kann die Signalintensität bei bekannter Laserfokusgröße auf die Anzahl der Moleküle, die sich in der Verbindungsstelle zwischen AuNP und Au-Film befinden, normiert werden.^[95] Da die Anzahl der AuNP auf diesen Filmen nicht ermittelt werden konnte, wurde das System geändert. Aus Praktikabilitätsgründen wurde zur besseren Kalibrierung der Signalintensitäten die Verwendung eines Silizium-Objekträgers herangezogen.

5.4.5 SERS mit AuNP@Si

Die Silizium-Objekträger bieten gleichmäßige, flache und chemisch funktionalisierbare Oberflächen für die Herstellung von nicht fluoreszenten SERS-Substraten. Die Silizium-Phononbande ist zudem als interne Referenz und zur Kalibrierung der Intensität in der Schwingungsspektroskopie verwendbar.

Die Ausbildung von dichtgepackten Monolagen mit den Citrat-stabilisierten AuNP (50 nm) wurde auf APTMS-funktionalisierten Silizium-Objekträgern erprobt. Wang und Liu wiesen die SERS-Aktivität von Amino-funktionalisierte Siliziumoberflächen mit Submonolagen aus Citrat-stabilisierten AuNP nach.^[115, 116] Die REM-Aufnahmen bestätigten die Anordnung der Nanopartikel als Submonolagen (Abbildung 5.19 links). Dichtgepackte Inseln aus AuNP konnte mit CTAB-stabilisierten Nanopartikeln (51 nm) erhalten werden (Abbildung 5.19 rechts). In dem hier vorgestellten Experiment wurden die super-sphärischen CTAB-stabilisierten AuNP (ca. 51 nm) als ein Tropfen auf einem unmodifizierten Silizium-Träger immobilisiert und bei 30 °C eingetrocknet. Eine Amino- oder Thiol-Funktionalisierung musste nicht durchgeführt werden, da die AuNP-Filme auch nach mehreren Waschschritten und Inkubation mit Raman-Reportern stabil blieben.

Die Verwendung von super-sphärischen Nanopartikeln liefert AuNP-Filme mit gleichen Abständen

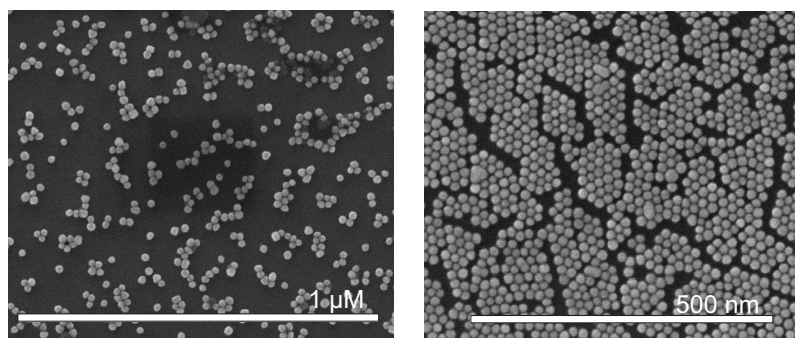


Abbildung 5.19: REM-Aufnahmen der AuNP-Filme immobilisiert auf Silizium-Träger links: AuNP mit APTMS-Funktionalisierung, rechts: AuNP ohne APTMS-Funktionalisierung.

zwischen den Nanopartikeln. Dies ermöglicht eine gleichmäßige plasmonische Verstärkung des Analytsignals in den *hot spots* zwischen den Nanopartikeln.

Abbildung 5.20 zeigt entsprechende SERS-Experimente für CRhSH (**1**), Rhodamin 6G und 4-MBA. Zunächst wurden die Nanopartikelmonolagen in einem kombinierten REM/SERS-Experiment identifiziert. Anschließend wurden die SERS-Intensitäten bei roter Anregungswellenlänge (632.8 nm) mit einem 50x Objektiv gemessen. Für die Darstellung der SERS-Spektren wurde der Fluoreszenzhintergrund abgezogen und die Spektren auf das Silizium-Signal bei 520 cm^{-1} normiert.

Eine Schwankung der Intensitäten für die Phononbande (520 cm^{-1}) um etwa 20% wurde für die Proben CRhSH (**1**) und Rhodamin 6G sowie um etwa 80% für die 4-MBA-Probe errechnet. Für CRhSH (**1**) wurden reproduzierbare Raman-Banden bei 1020 cm^{-1} ($\nu_a(\text{COC})\text{ Xa} + \nu_a(\text{CC})\text{ Xa} + \delta(\text{HSC})\text{ Xa} + \delta_{sc}(\text{NH})$), 1226 cm^{-1} (C=C, Ringatmung, Phenyl), 1636 cm^{-1} ($\delta(\text{NH})\text{ Xa} + \nu_s(\text{CC})\text{ Xa}$) detektiert (Abbildung 5.20 G). Das Raman-Spektrum von Rhodamin 6G ($625, 1200, 1370, 1400, 1540\text{ cm}^{-1}$) ist identisch mit literaturbekannten Spektren (Abbildung 5.20 H).^[55] Für 4-MBA wurde ebenso ein charakteristisches Bandenmuster (1184 cm^{-1} (C-C) und 1598 cm^{-1} (C=C)) erhalten (Abbildung 5.20 I).^[117] Die SERS-Signalintensitäten der Raman-Mode bei ca. 1340 cm^{-1} von **1** und Rhodamin 6G wurden verglichen. R6G liefert um ein Drittel mehr Signal (Abbildung 5.20 H, grüner Rechteck) als das thiolierter Rhodamin (**1**) (Abbildung 5.20 G, roter Rechteck). Die Anregungswellenlänge liegt näher an der Resonanz von Rhodamin 6G (Abbildung 5.13), was zu einer Verbesserung der Rhodamin 6G-Signalverstärkung führt. Bei dem Experiment mit 4-MBA wurden die stärksten Intensitätsschwankungen detektiert. Die SERS-Signale der Rhodamine sind nicht mit dem Signal von 4-MBA aufgrund der unterschiedlichen Streuquerschnitte vergleichbar. Signalintensitätsschwankungen aufgrund verschiedener Fokuseinsettoleranz wurden manuell soweit wie möglich durch Kalibration am Silizium-Signal ausgeglichen.

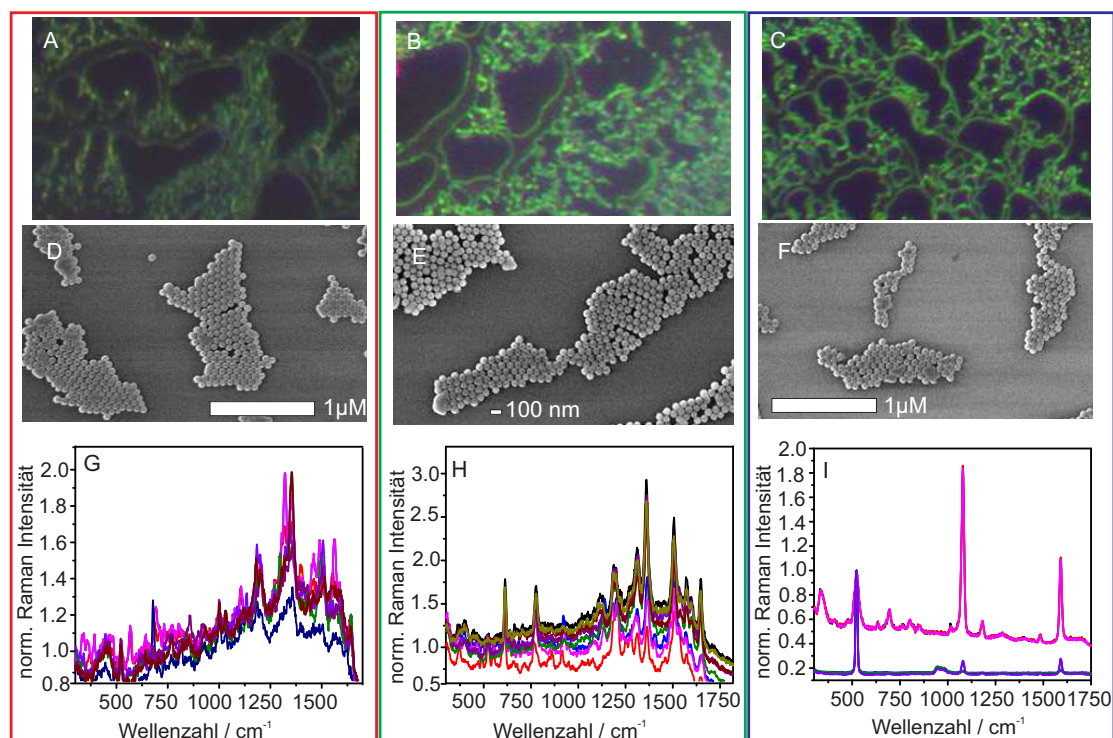


Abbildung 5.20: SERS-Experimente mit AuNP@Si-Substrat. A: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für CRhSH (**1**), B: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für Rhodamin 6G, C: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für 4-MBA, D: REM-Aufnahme von AuNP@Si für CRhSH (**1**), E: REM-Aufnahme von AuNP@Si für Rhodamin 6G, F: REM-Aufnahme von AuNP@Si für 4-MBA, G: SERS-Spektren von CRhSH (**1**) auf AuNP@Si, H: SERS-Spektren von Rhodamin 6G auf AuNP@Si, I: SERS-Spektren von 4-MBA auf AuNP@Si. Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 70 μ W, Integrationszeit 10 s.

Die gleichen Proben (**1** & R6G) wurden für SERRS-Experimente ebenso bei blauer Anregung (488 nm) untersucht. In Abbildung 5.21 ist das jeweilige Rohspektrum und ein basislinienkorrigiertes SERRS-Spektrum für die beiden Raman-Farbstoffe (**1** & R6G) gezeigt. Die Spektren wurden auf die Phononbande des Siliziums (520 cm^{-1}) normiert und die Signalintensitäten der Schwingungsbande bei 1670 cm^{-1} miteinander verglichen. Obwohl die Raman-Reporter vergleichbare Streuquerschnitte besitzen, wurde für **1** das dreifache Signal im Vergleich zu Rhodamin 6G detektiert. Die Signalverstärkung kann auf den Resonanzeffekt zurückgeführt werden. Die Nanopartikelfilme wurden für jeden Raman-Farbstoff an vier verschiedenen Positionen untersucht. Dabei wurden Signalintensitäten mit einer Abweichung von über 50% detektiert. Außerdem variierte die Intensität des Silizium-Signal des jeweiligen Substrates um mindestens 70%.

Für das thiolierte Rhodamin (**1**) wurde weniger Fluoreszenzhintergrundsignal als für Rhodamin 6G detektiert. Das Fluoreszenzsignal kann in Abhängigkeit vom Abstand zwischen einem Fluorophor und einer Metalloberfläche verstärkt oder gelöscht werden.^[118, 119]

Basierend auf diesen Ergebnissen der SERRS-Messungen (vgl. Abbildung 5.21) kann eine Aussage über das Adsorptionsverhalten der Rhodamin-Derivate getroffen werden. **1** bindet über die Thiolgruppen (Chemisorption) auf der Oberfläche der AuNP, sodass ein minimaler Abstand zwischen Chromophor und Substratoberfläche vorliegt, und eine Fluoreszenzlöschung vorrangig auftritt.

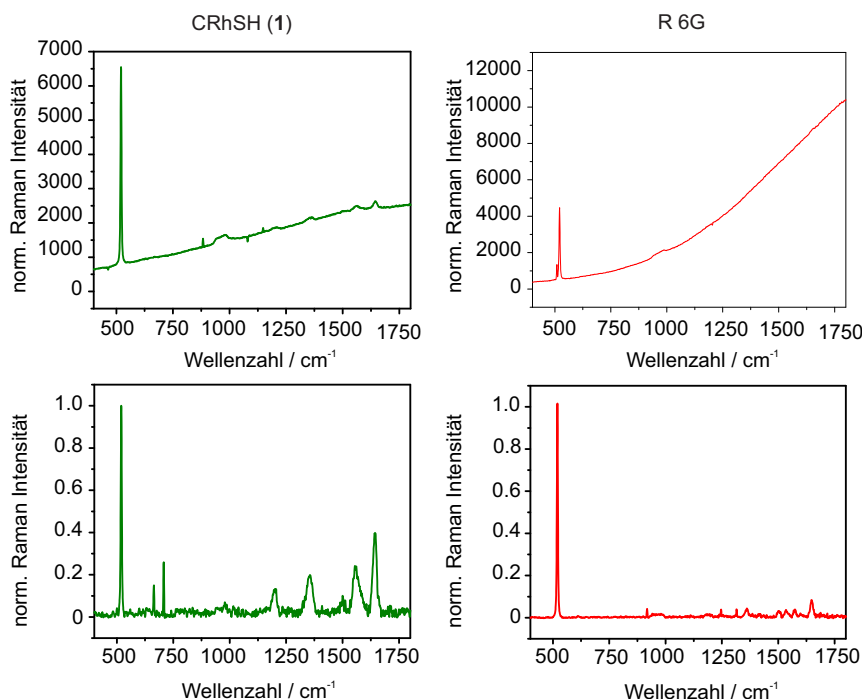


Abbildung 5.21: SERRS-Experimente von CRhSH(1) und R6G auf AuNP@Si für die blaue Anregungswellenlänge (488 nm). Leistung 20 mW, Integrationszeit 60 s. Oben: Rohspektren; unten: Fluoreszenzhintergrund korrigierte und auf die Bande bei 520 cm^{-1} (Silizium) normierte Spektren.

Rhodamin 6G bindet elektrostatisch (freie Elektronenpaare des Sauerstoffes oder Stickstoffes) auf den plasmonischen Oberflächen, was zu einem größeren Abstand zwischen Chromophor und AuNP führt und mit einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals einhergeht.

Des Weiteren wurden die AuNP-Filme per Punktrasterkartierung (engl. *point mapping*) SERS-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 5.22 A und C sind die entsprechenden Falschfarben-Bilder, basierend auf der Signalintensität der Raman-Bande bei 1200 cm^{-1} dargestellt. Abbildung 5.22 B und D zeigt die dazugehörigen SERS-Spektren mit ihren Standardabweichungen (grau). Die SERS-Messungen zeigen, dass beide Raman-Reporter vergleichbare Signalintensitäten liefern. Durch die Messungen konnte die Homogenität der SERS-Signale für beide Raman-Reporter CRhSH (1) und R6G auf dem AuNP-Film nachgewiesen werden. Ein Falschfarben-Bild wurde für die Phononbande von Silizium bei 520 cm^{-1} generiert. Es ist erkennbar, dass beide Raman-Reporter selektiv auf der Nanopartikeloberfläche binden. Die Adsorption von 1 erfolgt selektiv über die Thiolgruppen, während Rhodamin 6G über die freien Elektronenpaare des Sauerstoffes (Xanthengerüst) und dessen Stickstoffe bindet. Die SERS- Punktrasterkartierung-Experimente zeigten, dass das Siliziumsignal nur in den goldunbedecktem Bereichen präsent war. Eine Normierung der Signale wurde nicht durchgeführt, da Raman-Reporter@Au-Film und das Siliziumsignal am jeweiligen Ort nicht gleichzeitig beobachtbar waren, aufgrund der dicken Goldfilmschicht. Da Transmission der Gold-Filme von der Schichtdicke abhängig ist^[120], kann mehr Transparenz des AuNP-Filmes durch die Verwendung von 10 bis 30 nm großen AuNP erreicht werden.^[121] Die SERS-Punktkartierungsmessungen mit AuNP@Si-Substraten lieferten reproduzierbare SERS-Spektren der verwendeten Raman-Reporter.

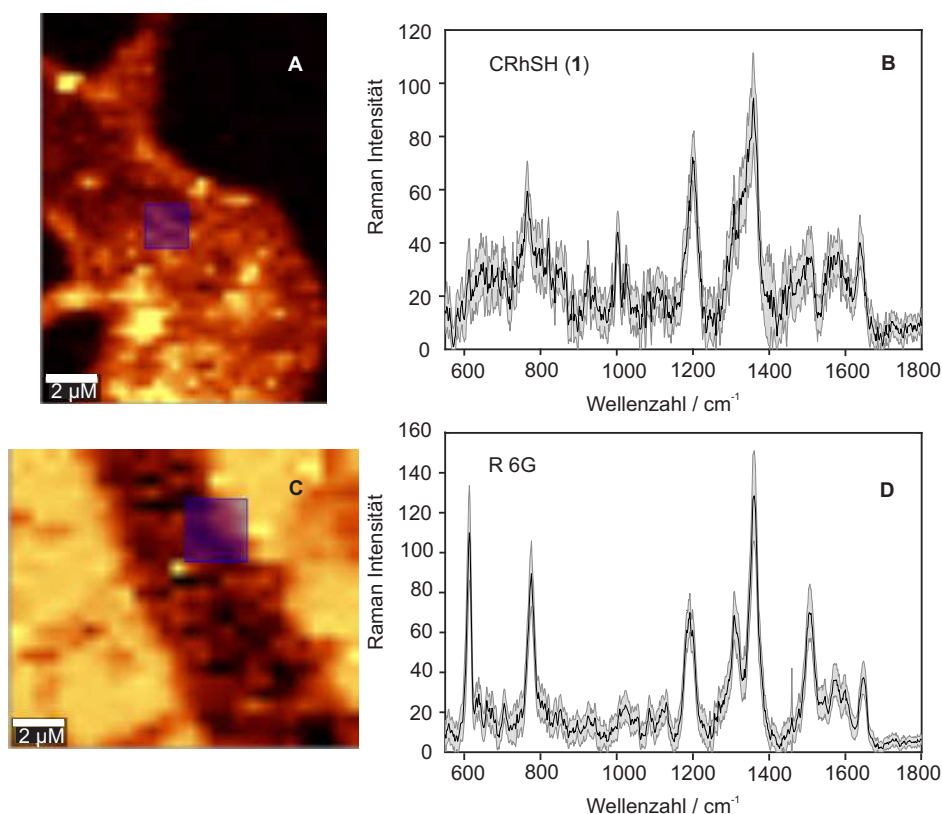


Abbildung 5.22: SERS-Experimente mit AuNP@Si-Substraten. A: Falschfarben-Bild von AuNP@Si für CRhSH (1), basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Bande bei 1200 cm^{-1} ; C: Falschfarben-Bild von AuNP@Si für R6G, basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Bande bei 1200 cm^{-1} ; B: gemittelte SERS-Spektren von CRhSH (1); D: gemittelte SERS-Spektren von R6G. Die graue Schattierung verdeutlicht die Standardabweichung. Schrittweite 300 nm , Integrationszeit 1 s , Leistung $70\text{ }\mu\text{W}$, Anregungswellenlänge 632.8 nm .

5.5 Zusammenfassung Rhodamin-Raman-Farbstoffe

Im Kapitel 5.1 wurden die Synthesen der thiolierten Rhodamine vorgestellt.

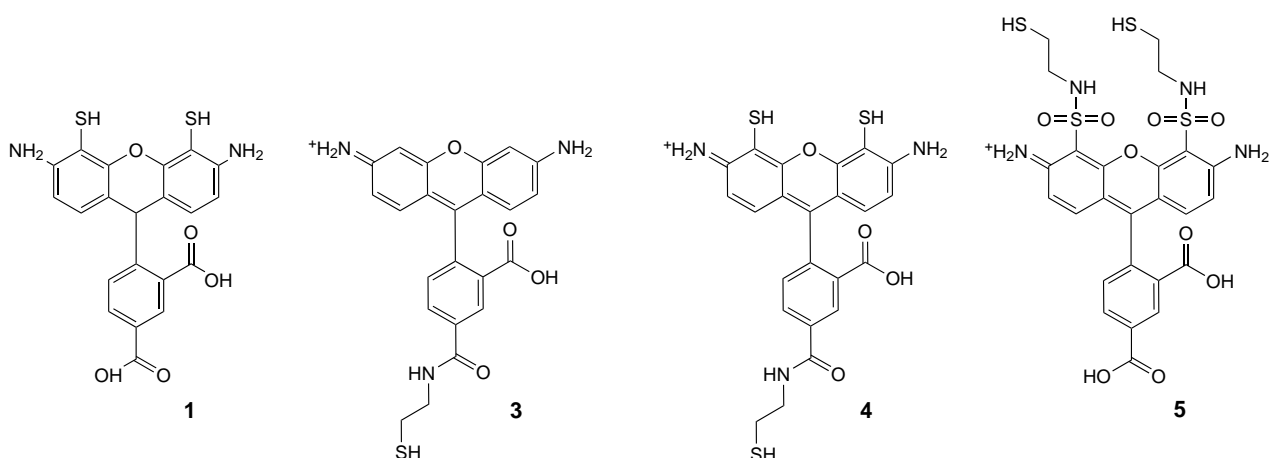


Abbildung 5.23: Schematische Darstellung der thiolierten Rhodamine

Für die Synthese von CRhSH (1) wurden mehrere Ansätze ausprobiert. Zuerst sollte der Farbstoff Alexa 488 hergestellt und über die Reduktion mit komplexen Hydriden zu 1 umgewandelt wer-

den. Bei diesem Ansatz konnte zum einen keine zufriedenstellende Reinheit der Zwischenstufen und zum anderen keine Umsetzung zum gewünschten Produkt erreicht werden. Ausgehend von 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) konnte **1** infolge einer Triphenylphosphin/Iod-Reduktion hergestellt werden. Die Einführung der Thiolgruppen erfolgte direkt am Chromophor, um die optimale Interaktion zwischen der Metalloberfläche eines SERS-Substrates und dem Raman-Reporter **1** zu erreichen. Außerdem sollten **1** und **2** mit thiolierten Abstandshaltern modifiziert werden. Dazu wurde Cysteamin mittels einer Steglich-Reaktion an die Rhodamin-Derivate gekoppelt. Die Synthese von **3** erfolgte mittels einer Carbodiimid/DMAP-Aktivierung. Jedoch wurde keine zufriedenstellende Reinheit von **3** erreicht. Die Synthese von **4** wurde nach derselben Methode durchgeführt. Die Isolierung der reinen Produkte **4** und **5** erwies sich als nicht möglich.

Des Weiteren sollte das Adsorptionsverhalten der neuen Raman-Reporter mittels SERS untersucht werden. Hierzu sind zwei Ansätze denkbar: a) Detektion einer neuen Bande in Raman-Spektrum, die einer Au-S- oder Au-N-Schwingung entspricht, b) Verstärkung bestimmter Raman-Signale des Moleküls durch das SERS-Substrat, die aufgrund des kleinen Abstandes zwischen dem Molekül und der Metalloberfläche entsteht. Für den Ansatz a) wurden Vorarbeiten durchgeführt, indem verschiedene Raman-aktive Moleküle (MBA, DTNB, Anilin, Aminothiophenol) mit funktionellen Thiol- und Aminogruppen mit AuNP und AgNP inkubiert und mittels SERS untersucht wurden (Kapitel 5.2). Die experimentellen Daten zusammen mit den Literaturdaten zeigten, dass eine eindeutige Zuordnung einer Au-S- oder Au-N-, sowie Ag-S- und Ag-N-Schwingung im SERS-Spektrum nicht möglich ist. Vermutlich ist die Detektion dieser Raman-Moden aufgrund der nicht-resonanten Anregung (632.8 nm Laseranregungswellenlänge) nicht realisierbar.

Beim Ansatz b) wurden zunächst die Raman-Farbstoffe **1**, **2**, **3** und **4** mit sphärischen AuNP und AgNP inkubiert. Aufgrund der unkontrollierten Aggregation der AuNP konnte kein reproduzierbares Bandenmuster für die untersuchten Raman-Farbstoffe erhalten werden. Die SERS-Experimente mit den Gold-Nanosternen (Kapitel 5.4.3) bestätigten die Adsorption von CRhSH (**1**) über die Thiolgruppen, da die Banden bei 940 cm^{-1} und 1020 cm^{-1} verstärkt wurden. Diese entsprechen den Normalmoden, die Schwefelatome enthalten. Bei dem Spektrum für 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) wurden zwei Signale bei 1200 cm^{-1} und 1360 cm^{-1} detektiert. Diese werden den C=C-Streckschwingung der Xantheneinheit, C-N-Streckschwingung und NH-Schaukel-schwingung zugeordnet. Somit wurde die Adsorption von **2** über den Xanthenring und über Aminogruppen auf der Metalloberfläche der AuNS nachgewiesen. Jedoch erwiesen sich die Gold-Nanosterne für einen quantitativen Vergleich der Signalintensitäten von **1**, **2** und Rhodamin 6G aufgrund der inhomogenen Form und Unstabilität als nicht geeignet. Eine Kontrolle von Morphologie und Stabilität von Gold-Nanosternen wurde von Jiang während des Herstellungsprozesses durch die Variation der Stabilisatorkonzentration erfolgreich durchgeführt.^[122] Dieser Ansatz kann die Synthese von monodispersen Gold-Nanosternen und somit die Ergebnisse der hier vorgestellten SERS-Messungen verbessern.

Mittels DFT-Berechnungen wurde eine genaue Raman-Bandenzuordnung durchgeführt und die DFT unterstützte Berechnung des molekularen elektrostatischen Potentials halfen die Adsorptionsseite von **1** und **2** zu definieren. Basierend auf diesen Berechnungen wurde die Adsorption über die Thiolgruppen von **1** und über die Aminogruppen von **2** vorausgesagt (Kapitel 5.4.1).

Die Absorptions- und Fluoreszenzmessungen zeigten, dass sich eine Einführung der Thiolgruppen am Chromophor wie bei CRhSH (**1**) nicht nachteilhaft auf die Fluoreszenzlebensdauer (ca. 4 ns) auswirkte. Außerdem eignet sich der neue thiolierte Fluoreszenzfarbstoff (**1**) für Anwendungen mit

grünem Laserlicht (Kapitel 5.4.2).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden neben SERS-Substraten in Form eines Kolloids feste plasmonisch-aktive Substrate für quantitative SERS-Experimente verwendet. Hierfür wurden super-sphärische ca. 51 nm AuNP auf einer glatten Gold-Oberfläche (Au@Au-Substrat, Kapitel 5.4.4) und auf einem Silizium-Objektträger (Au@Si-Substrat, Kapitel 5.4.5) immobilisiert. Die REM-Aufnahmen zeigten eine homogene Anordnung (Monolagen) der CTAB-stabilisierten AuNP auf der Silizium-Oberflächen, welche auch für die Gold-Oberflächen erwartet wurde. Aufgrund der perfekt runden Form der AuNP wurden gleiche Abstände zwischen den Nanopartikeln und die daraus resultierende gleichmäßige Signalintensitätsverteilung gewährleistet. Die SERS-Experimente mit dem Au@Au-Substrat lieferten reproduzierbare SERS-Spektren von **1**, **2** und Rhodamin 6G. Die generierten Signalintensitäten konnten jedoch nicht verglichen werden, da kein Signal zur Normierung der Intensitäten (interner Standard) herangezogen werden konnte.

Bei dem Au@Si-Substrat wurde die Silizium-Phononbande als interner Standard verwendet. Die SERS-Punktrasterkartierung-Experimente (engl. *point mapping*) lieferten reproduzierbare Spektren der untersuchten Raman-Farbstoffe **1** und Rhodamin 6G. Eine Quantifizierung der Signalintensitäten erwies sich als schwierig, weil die Silizium-Phononbande nur in goldunbedeckten Bereichen detektierbar war.

Zur Verbesserung der Experimente mit einem Au@Si-Substrat sollten ca. 25-30 nm große super-sphärische AuNP eingesetzt werden. Dadurch wird die Schichtdicke des Gold-Filmes verringert und die Durchdringtiefe des verwendeten Laserlichtes ausreichen, um die Phononbande von Silizium zu detektieren. Des Weiteren muss die Immobilisierung der AuNP soweit verbessert werden, dass sich reproduzierbar gleichgroße AuNP-Inseln auf einem Silizium-Objektträger ausbilden. Denn es ist für ein quantitatives SERS-Experiment wichtig, dass die gemessenen Signalintensitäten von der gleichen Anzahl der *hot spots* verstärkt werden. Eine APTMS-Funktionalisierung kann die Bedeckung der Silizium-Objektträger mit AuNP verbessern.

5.6 Organisch-chemische Synthese und optische/spektroskopische Charakterisierung von thiolierten Polyenen

5.6.1 Synthesen der Acetyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (29) und (30)

Für die vinylischen thiolierten Polyene sind nur wenige Synthesen bekannt. Beispielsweise wurde von Branchadell im Jahr 1991 aus Methyl-(E)-4-oxo-2-butenolat und [(Methylthio)methyl]triphenylphosphoniumchlorid das vinylische thiolierte Polyen Methyl-(E,E)- und (E,Z)-(methylthio)penta-2,4-dienoat hergestellt.^[123] Jedoch ist die Synthese schlecht anwendbar wegen des verwendeten krebserregenden Lösungsmittels HMPT. Außerdem eignet sich die Methyl-Schutzgruppe am Schwefel nicht für die Stabilisierung von Polyenkett. Usta konnte im Jahr 2013 ein monothioliertes Polyen-Derivat durch einen Phenylring besser stabilisieren.^[124]

Ein möglicher Syntheseweg für die Herstellung von thiolierten vinylischen Polyenen ist in Abbildung 5.24 vorgestellt. Hierbei sollen ein Thio-modifiziertes Horner-Emmons-Reagenz und eine Polyen-Kette mit einer terminalen Aldehyd-Funktionalität durch eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion verknüpft werden.

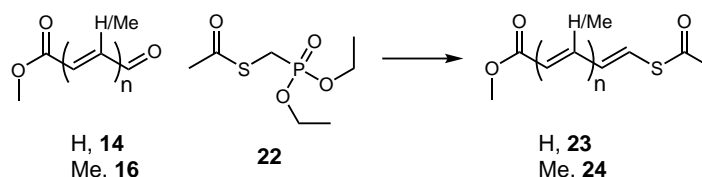


Abbildung 5.24: Synthesestrategie zur Herstellung von vinylischen Thioacetat modifizierte Polyenen (**23**) und (**24**).

In Abbildung 5.25 sind die Syntheseschritte zur Herstellung von Bausteinen **14**, **16** und **22** vorgestellt. Zunächst wurde 3-Iodo-2Z-propensäuremethylester (**12a**) aus Methylpropiolat (**11**) und Lithiumiodid nach Lu hergetellt.^[125] Laut NMR-Spektroskopie wurde das Produkt als ein Z-Isomer isoliert. Dieselbe Stereochemie wurde von Lu im Jahr 1992 beschrieben. Des Weiteren zeigte Lu, dass Acrolein (**13**) an ein vinylisches Halogenid über eine Palladiumacetat/Silbercarbonat-katalysierte Heck-Reaktion gekoppelt werden kann. Jedoch zeigte Heck im Jahr 1982, dass solche Reaktion wegen Polymerisation von **13** schwer durchzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Synthese von **13** nach Zweifel^[126] ausprobiert. Jedoch polymerisierte **13**, sodass die Synthese von Methyl-(2E,4E)-6-oxohexa-2,4-dienoat (**14**) nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Heck-Reaktion mit Methacrolein (**15**) lieferte Methyl-(2E,4E)-5-methyl-6-oxohexa-2,4-dienoat (**16**) mit 39% Ausbeute.

Die Synthese der thiolierten Polyene sollte über eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion unter Verwendung von S-((diethoxyphosphoryl)methyl)ethanthioat (**22**) erfolgen. Die Synthese von **22** wurde schon 1989 von Farrington *et al.* vorgestellt^[127] und ist in Abbildung 5.25 als Syntheseschritt drei dargestellt. Nach der Umsetzung von para-Formaldehyd (**19**) mit Thioessigsäure (**18**) zu S-(Hydroxymethyl)ethanthioat (**20**) und anschließender Bromierung mit Phosphortribromid wurde S-(Bromomethyl)ethanthioat (**21**) erfolgreich synthetisiert. Das Horner-Emmons-Reagenz **22** wurde infolge der Arbuzov-Reaktion von **21** mit Triethylphosphin mit 80% Ausbeute hergestellt.

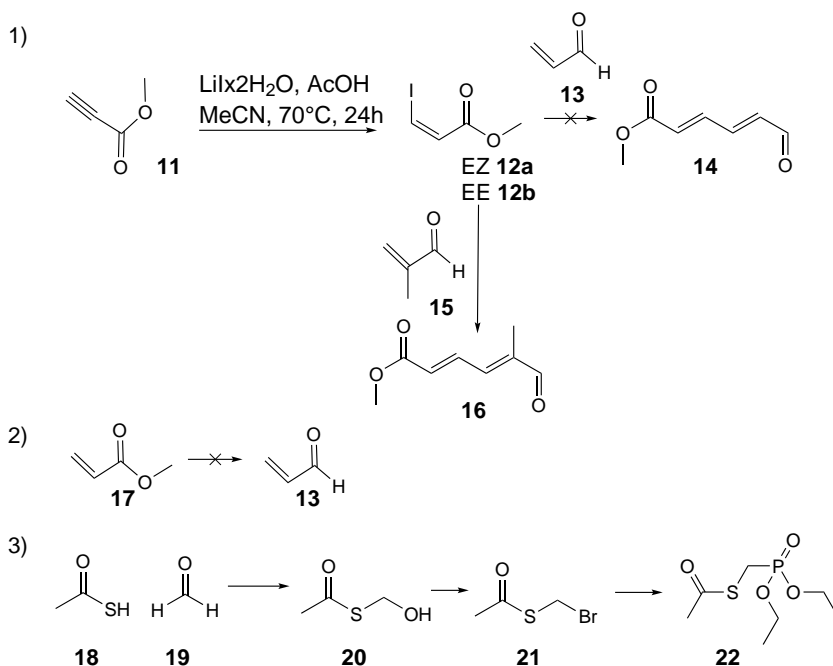


Abbildung 5.25: Syntheseschritte für den Aufbau von vinylischen Polyketten und die Einführung der Acetyl-geschützten Thiolgruppe an einem Polyen-Terminus mittels einer Horner-Emmons Reaktion.

Eine alternative Methode zur Herstellung von vinylischen Polyenen ist in Abbildung 5.26 gezeigt. Dabei sollte ein Polyen mit einer terminalen Iod-Gruppe und n Doppelbindungen synthetisiert werden. Erst zum Schluß wird Schwefel als ein Thioacetat über eine nucleophile Substitution an einem sp^2 -Kohlenstoff eingeführt.

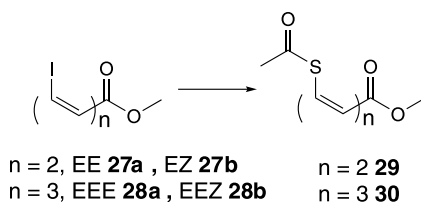


Abbildung 5.26: Synthesestrategie zur Herstellung von vinylischen Thioacetat-modifizierten Polyenen (**29**) und (**30**).

Die durchgeführten Synthesen sind in Abbildung 5.27 zusammengefasst. Ausgehend von **11** wurde eine DIBAL-H-Reduktion zum entsprechenden Alkohol **25** durchgeführt. Anschließend wurde der Baustein **27** als ein EE/EZ-Isomerengemisch (9:1) durch eine Mangan(II)-oxid-Oxidation & Wittig-Reaktion in situ nach Taylor^[128, 129] hergestellt. Bei der Synthese von **28** wurde ebenso ein EEE/EEZ-Isomerengemisch (1:1) mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Um die thiolierten Polyene **29** und **30** in der all-trans Konfiguration synthetisieren zu können, wurden die Vorstufen **27b** und **28b** über I_2 -Isomerisierungsreaktion modifiziert. Anschließend folgte die nucleophile Substitution am sp^2 -Kohlenstoff unter Abspaltung des Iodids. Das Thioacetat lag deprotoniert vor, da es als ein Kaliumsalz eingesetzt wurde und somit als ein starkes Nucleophil fungierte. Während **29** nach einer wässrigen Aufarbeitung mit 90% Ausbeute isoliert wurde, konnte **30** mit nur 15% Ausbeute hergestellt werden. Eine vollständige Umsetzung zum gewünschten Produkt konnte auch durch die Verlängerung der Reaktionszeit bis zu 48 Stunden nicht erhalten werden. Außerdem wurde eine Zersetzung der Verbindung **30** nach drei Wochen (Schutzgasatmosphäre, 4°C) beobachtet.

Das kann dadurch erklärt werden, dass die basenlabile Acetyl-Schutzgruppe des Schwefels kaum die Polyenkette stabilisiert.

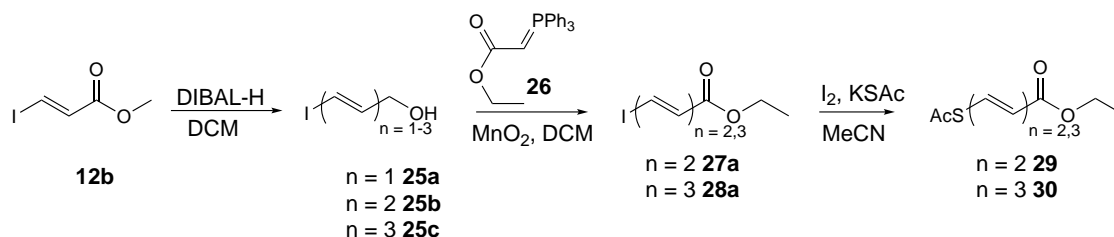


Abbildung 5.27: Syntheseschritte für den Aufbau einer vinylischen Polyenkette und die Einführung der Acetyl-geschützten Thiolgruppe mittels einer nucleophilen Substitution an einem sp^2 -Kohlenstoff.

5.6.2 Synthese der *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (**33**) und (**34**)

Polyenketten lassen sich durch sterisch anspruchsvolle Gruppen an den Termini stabilisieren.^[130] Basierend darauf wurden Synthesroute für die *tert*-Butyl-geschützten thiolierten Polyen-Derivate **33** und **34** entwickelt. Die dazu durchgeführten Synthesen sind in Abbildung 5.28 zusammengefasst.

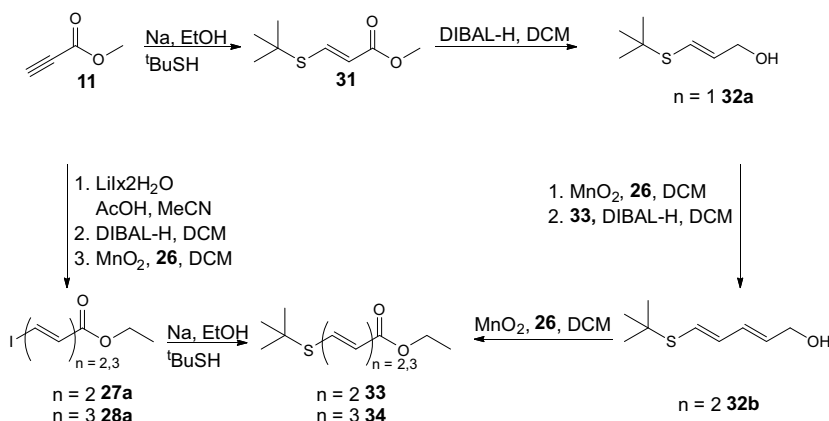


Abbildung 5.28: Syntheseübersicht zur Herstellung von vinylischen Polyenen (**33**) und (**34**).

Der erste Ansatz beginnt mit einer nucleophilen Addition am Alkin **11**. Dabei wird *tert*-Butylmercaptan mit Natriumethanolat deprotoniert und es folgt ein nucleophiler Angriff am Methylpropiolat (**11**). Die Umsetzung lieferte das gewünschte Produkt **31** mit 30% Ausbeute. Die Kettenverlängerung erfolgte über DIBAL-H-Reduktion mit anschließender Mangan(II)-oxid-Oxidation & Wittig-Reaktion in situ, wodurch die Zielverbindungen **33** und **34** isoliert wurden.

Bei dem zweiten Ansatz wurden erst die Verbindungen **27a** und **28a** (Abbildung 5.28) hergestellt. Ausgehend von **27a** konnte **33** infolge einer nucleophilen Substitution mit 90% Ausbeute erhalten werden. Für die Synthese von **34** können **33** oder **28a** als Ausgangsstoffe eingesetzt werden. Bei der Umsetzung von Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoat (**33**) mit DIBAL-H und konnte **34** infolge einer Wittig-Reaktion mit **26** mit 10% Ausbeute erhalten werden. Die nucleophile Substitution an **28a** liefert dasselbe Produkt **34** mit 60 % Ausbeute. Somit erwies sich die nucleophile Substitution am vinyllischen Halogenid als eine bessere Methode zur Herstellung von vinyllischen linearen Polyenen (**33**) und (**34**).

5.6.3 Synthese von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**)

In diesem Abschnitt werden die Synthesen der Polyene, die an einem Terminus durch einen Phenylring stabilisiert werden, zusammengefasst. Eine *tert*-Butyl-Schutzgruppe und Phenylringe^[131] stabilisieren länger-kettigen Polyene. Außerdem lässt sich durch die Einführung des Benzolrings das π -System des Moleküls erweitern.

Die Übersicht in Abbildung 5.29 zeigt die Syntheseroute zur Herstellung von phenylischen Polyenen. Zuerst wurde 4-Bromo-benzaldehyd (**35**) nach Kersting^[132] mittels einer nucleophilen Substitution am Aromaten zu 4-(*tert*-Butylthio)benzaldehyd **36a** umgesetzt. Die Ausbeute konnte durch Zugabe von 6 Äquivalenten Kaliumcarbonat bis 98% optimiert werden, sodass für diese Stufe keine weiteren Reinigungsschritte benötigt wurden. Der Aufbau der Polyenkette erfolgte über die Kombination aus DIBAL-H-Reduktion und Mangan(II)-oxid-Oxidation & Wittig-Reaktion *in situ*. Dabei wurde im ersten Syntheseschritt (DIBAL-Reduktion) das jeweilige allylische Alkohol (z. B. **38a**) synthetisiert. Dieser wurde im zweiten Syntheseschritt zu dem Ester (z. B. **39**) umgewandelt. Alle Zielverbindungen konnten in guten Ausbeuten synthetisiert werden. Auf diese Weise wurde die Polyenkette pro Kombination jeweils um eine Doppelbindung verlängert.

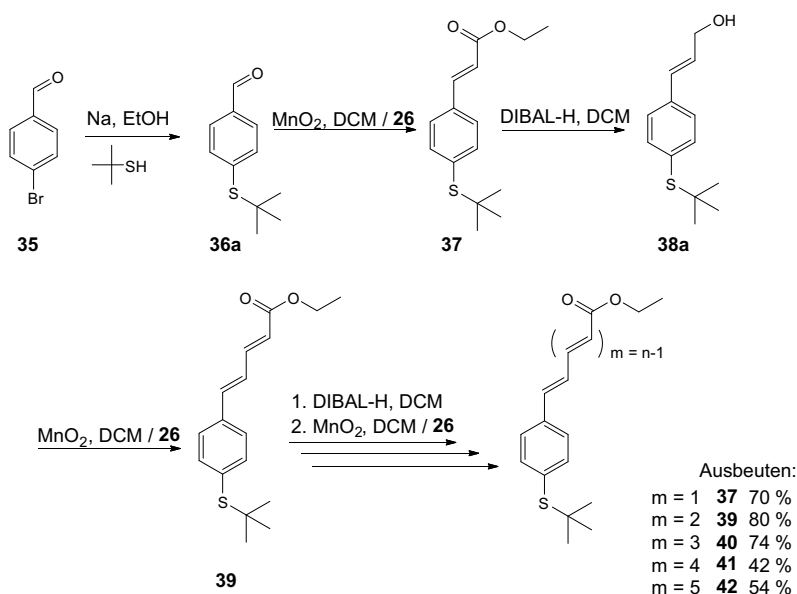


Abbildung 5.29: Syntheseübersicht für die Herstellung von phenylischen Polyenketten mittels Wittig-Reaktion und die Einführung einer *tert*-Butyl-geschützten Thiolgruppe mittels nucleophilen Substitution am Aromaten. m gibt die Anzahl der Doppelbindungen des jeweiligen Polyens. Die Charakterisierung der synthetisierten allylischen Alkohole **38b**, **38c** und **38d** ist bei den Synthesevorschriften zu finden.

Eine weitere Synthesevariante ist die Kopplung über die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion. Vorteilhaft bei der Synthese Strategie (Abbildung 5.30) gegenüber der zuvor beschriebenen Strategie ist die Möglichkeit der Kettenverlängerung um mehr als eine Doppelbindung pro Reaktionsschritt.

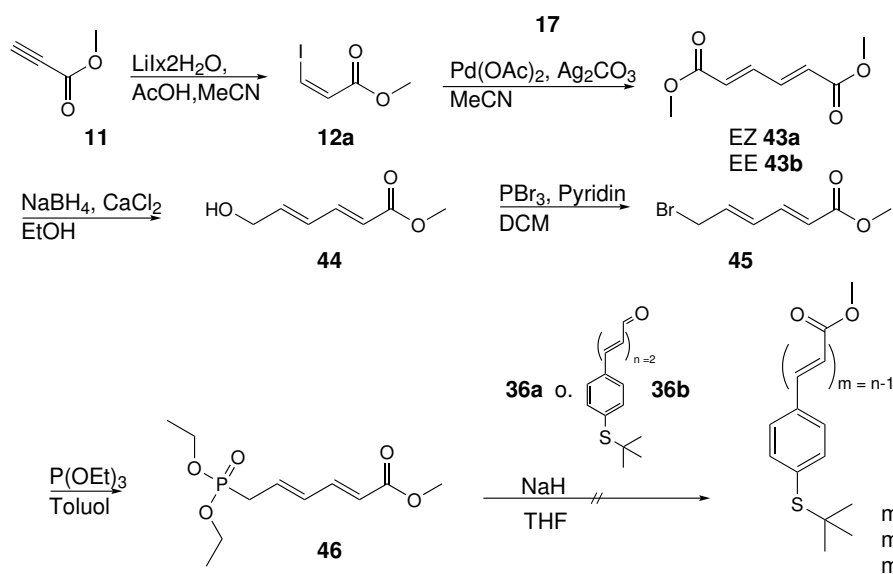


Abbildung 5.30: Syntheseschritte für die Herstellung von phenylischen Polyenketten mittels einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion.

Cossy stellte im Jahr 2009 die Synthese von Diethylphosphonat (**46**) vor.^[133] Ausgehend vom allylischen Bromid **45** konnte **46** mit 99 % Ausbeute hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Michaelis-Arbuzov-Reaktion ebenso ausgehend von **45** wiederholt und **46** mit einer Ausbeute von 19% isoliert. Für die Synthese von **40**, **41** und **42** wurde die Deprotonierung des

Ylids (**46**) mit Natriumhydrid durchgeführt. Jedoch konnte die Knüpfung mit dem jeweiligen Aldehyd (z. B. **36a**) nicht erzielt werden. Im Jahr 2014 stellten Madden und Whiting Synthesestrategien zu Herstellung von nicht-isoprenoiden Polyenen unter Verwendung von **46** und LDA vor.^[134] Ebenso setzte Cossy **46** mit LDA um.^[133] Vermutlich kann der hier beschriebene Syntheseansatz durch Umsetzung mit einer stärkeren und sterisch anspruchsvollen Base, wie LDA, *n*-BuLi oder NaHMDS, verbessert werden.

5.7 Absorption, Raman-Spektroskopie und SERS der monothiolierten vinylischen Polyene

Abbildung 5.31 präsentiert die synthetisierten linearen vinylischen thiolierten Polyen-Derivate. Dabei wird zwischen Acetyl- (**29** (AcS-2DB) und **30** (AcS-3DB)) und *tert*-Butyl-geschützten (**33** (*t*BuS-2DB) und **34** (*t*BuS-3DB)) thiolierten Polyenen unterschieden.

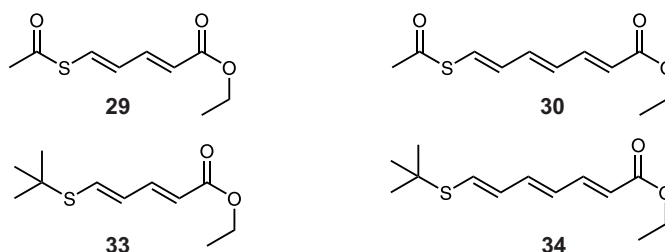


Abbildung 5.31: Synthetisierte vinylischen Polyene AcS-2DB (**29**), AcS-3DB (**30**), *t*BuS-2DB (**33**) und *t*BuS-3DB (**34**).

5.7.1 Raman-spektroskopische Charakterisierung von Acetyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyenen (**29**) und (**30**)

Zunächst wurden die Streuquerschnitte von **29** und 4-Mercaptobenzoessäure verglichen. Dazu wurden Raman-Reporter-Lösungen mit den Konzentrationen von 200, 100, 50, 25, 10 und 5 mM hergestellt und Raman-spektroskopisch charakterisiert. Die Spektren wurden auf die Bande bei 887 cm⁻¹ (Ethanol) normiert. Die C=C-Streckschwingung des Polyens **29** konnte schon bei einer Konzentration von 5 mM detektiert werden (Abbildung 5.32 links). Die Signalintensität steigt zusammen mit der Konzentration des Raman-Reporters **29**. Eine Sättigung des Signals wurde für **29** für die Konzentration von 100 mM detektiert. Es fällt auf, dass zur Detektion der C=C-Streckschwingung (Phenylring) von 4-MBA mindestens eine Konzentration von 25 mM benötigt wird (Abbildung 5.32 rechts). Dieses Experiment zeigt, dass das Polyen **29** einen größeren Raman-Streuquerschnitt als 4-MBA aufweist und für die Aufnahme eines Raman-Spektrums von **29** in einer ethanolischen Lösung nur ein Fünftel der Konzentration von 4-MBA (zum Vergleich grüne Spektrum 5 mM (Abbildung 5.32 links) und grünes Spektrum 25 mM (Abbildung 5.32 rechts) notwendig ist.

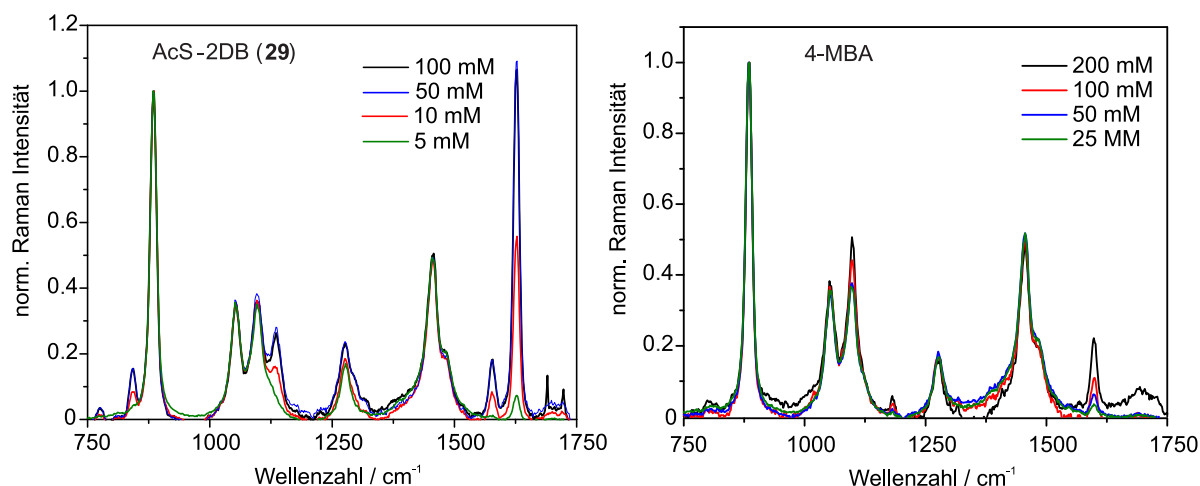


Abbildung 5.32: Links: Raman-Spektren von Acetyl-geschütztem Polyen AcS-2DB (**29**); rechts: Raman-Spektren von 4-MBA. Die Spektren sind auf die Ethanol-Bande bei 887 cm^{-1} normiert. Integrationszeit 20 s, Leistung 10 mW, Anregungswellenlänge 632.8 nm .

Des Weiteren sollte die SERS-Aktivität der Polyene **29** und **30** untersucht werden. Zur Aufnahme der SERS-Spektren bei roter Laseranregung (632.8 nm) wurden die Raman-Reporter zunächst ohne Entschützung des Thiol-Terminus mit AuNS und Au/Ag-Nanoschalen inkubiert. Bei diesem Experiment konnten keine Raman-Signale der verwendeten Raman-Reporter detektiert werden. Das Experiment wurde wiederholt, nachdem die Acetyl-Schutzgruppe basisch abgespalten wurde. Um den Aggregationszustand der eingesetzten SERS-Nanopartikel zu untersuchen, wurden Extinktionspektren der AuNS (Abbildung 5.33 oben links) und Au/Ag-Nanoschalen (Abbildung 5.33 oben rechts) gemessen. Die SERS-Spektren (Abbildung 5.33 links unten) wurden bei gleichen Konzentration der AuNS aufgenommen. Es treten vier SERS-Beiträge im blauen Spektrum (AcS-3DB **30**) auf: 1593 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung), 1536 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung), 1221 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$ -Streckschwingung) und 1136 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$ -Streckschwingung). Im roten Spektrum (AcS-2DB **29**) sind drei dominante SERS-Beiträge bei 1616 cm^{-1} und 1553 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung) und 1137 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$ -Streckschwingung) zu erkennen. Die Extinktionsspektren zeigen alle einen unterschiedlichen spektralen Verlauf nach der Funktionalisierung mit Raman-Reportern. Dies deutet auf die Aggregation der Kolloide hin, die einen quantitativen Vergleich der Raman-Signalintensitäten erschwert.

Die SERS-Spektren mit den Gold/Silber-Nanoschalen weisen die gleichen Raman-Bandenmuster auf. Es fällt jedoch auf, dass für die Polyene **29** und **30** (blaue und rote Linie) etwa gleich viel Signal erhalten wurden (Abbildung 5.33 unten rechts) und die SERS-Beiträge von 4-MBA sechs mal intensiver sind. Diese Unterschiede der Signalintensitäten sind auf die starke Aggregation der Au/Ag-Nanoschalen (Abbildung 5.33 oben rechts) zurückzuführen.

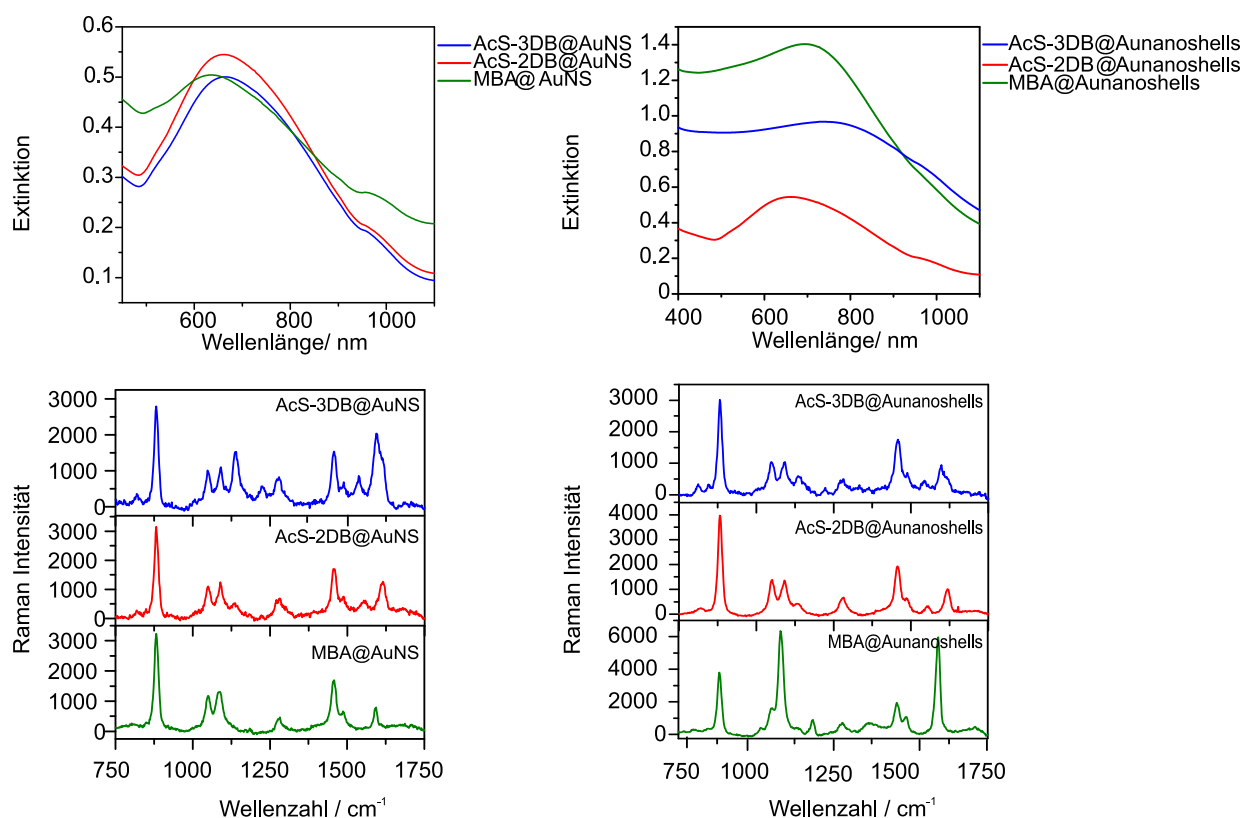


Abbildung 5.33: Links oben: Extinktionsspektren der AuNS nach der Inkubation mit AcS-3DB (**30**), AcS-2DB (**29**) und 4-MBA; rechts oben: Extinktionsspektren der Au/Ag-Nanoschalen nach der Inkubation mit AcS-3DB (**30**), AcS-2DB (**29**) und 4-MBA; links unten: SERS-Spektren von AcS-3DB (**30**), AcS-2DB (**29**) und 4-MBA mit AuNS; rechts unten: SERS-Spektren von AcS-3DB (**30**), AcS-2DB (**29**) und 4-MBA mit Au/Ag-Nanoschalen. Integrationszeit 20 s, Leistung 10 mW, Laseranregungswellenlänge 632.8 nm.

5.7.2 Absorptionsspektren von monothiolierten vinylischen Polyenen (**33**) und (**34**)

Da die Schutzgruppe keinen Einfluß auf das konjugierte π -System und somit keinen Einfluß auf die relevanten optischen und spektroskopischen Eigenschaften der vinylischen Polyene hat, wurden alle weiteren Experimente mit den *tert*-Butyl-geschützten Polyenen durchgeführt. Ebenso wurden alle Computer-unterstützten Rechnungen für **33** und **34** (Abbildung 5.31) vorgenommen. Die DFT-berechneten Absorptionsspektren sind in Abbildung 5.34 rechts vorgestellt. Für das Polyen **33** mit zwei Doppelbindungen wurde ein Absorptionsmaximum bei ca. $\lambda_{max} = 350$ nm und eine Rotverschiebung von ca. 60 nm von dem Absorptionsmaximum des Polyens mit drei Doppelbindungen **34** ($\lambda_{max} = 415$ nm) vorhergesagt. Experimentell wurde eine Rotverschiebung von ca. 30 nm (Abbildung 5.34 links) bestimmt.

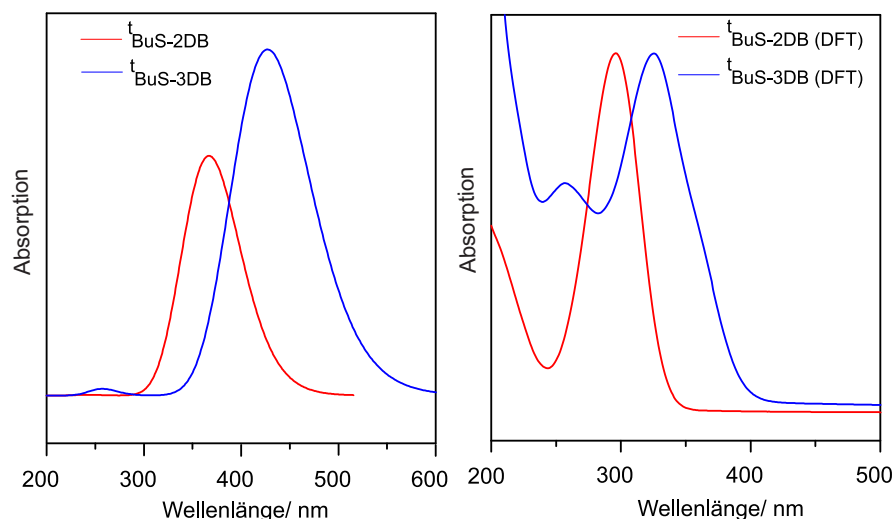


Abbildung 5.34: Links: Absorptionsspektren von 10 μM ethanolischen Lösungen der vinylischen Polyene $t\text{BuS-2DB}$ (**33**) und $t\text{BuS-3DB}$ (**34**), rechts: DFT-berechneten Absorptionsspektren der vinylischen Polyene $t\text{BuS-2DB}$ (**33**) und $t\text{BuS-3DB}$ (**34**).

5.7.3 Raman-spektroskopische Charakterisierung von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene (**33**) und (**34**)

Zunächst wurden die Schwingungsspektren für die Verbindungen **33** und **34** simuliert (Abbildung 5.35 oben links). Experimentell wurden die Raman-Spektren für **33** und **34** bei zwei Anregungswellenlängen (488 nm und 632.8 nm) (Abbildung 5.35 oben rechts und unten Mitte) gemessen. Dabei wurden die Proben als Pulver untersucht. Die experimentell bestimmten Spektren stimmen gut mit den simulierten Raman-Spektren überein. Die C=C-Schwingungsbande (ca. 1668 cm^{-1}) im simulierten Raman-Spektrum des Polyens mit drei Doppelbindungen **34** weist eine Schulter bei 1683 cm^{-1} (Tab. 5.3) und eine weitere Bande bei 1615 cm^{-1} auf. Für das Polyen mit zwei Doppelbindungen **33** wird neben der Normalmode bei 1684 cm^{-1} ein zweite Raman-Bande bei 1630 cm^{-1} (Tab 5.3) vorhergesagt. Die experimentell gemessenen Raman-Spektren weisen ebenso die Aufspaltung der C=C-Normalmode bei kurzen konjugierten Polyen-Systemen auf, generiert durch die preresonante Anregung der energetisch höheren Anregungswellenlänge. Insgesamt konnte die Verschiebung dieser Normalmoden zu kleineren Wellenzahlen, die wegen der Vergrößerung des Chromophors entsteht, nachgewiesen werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

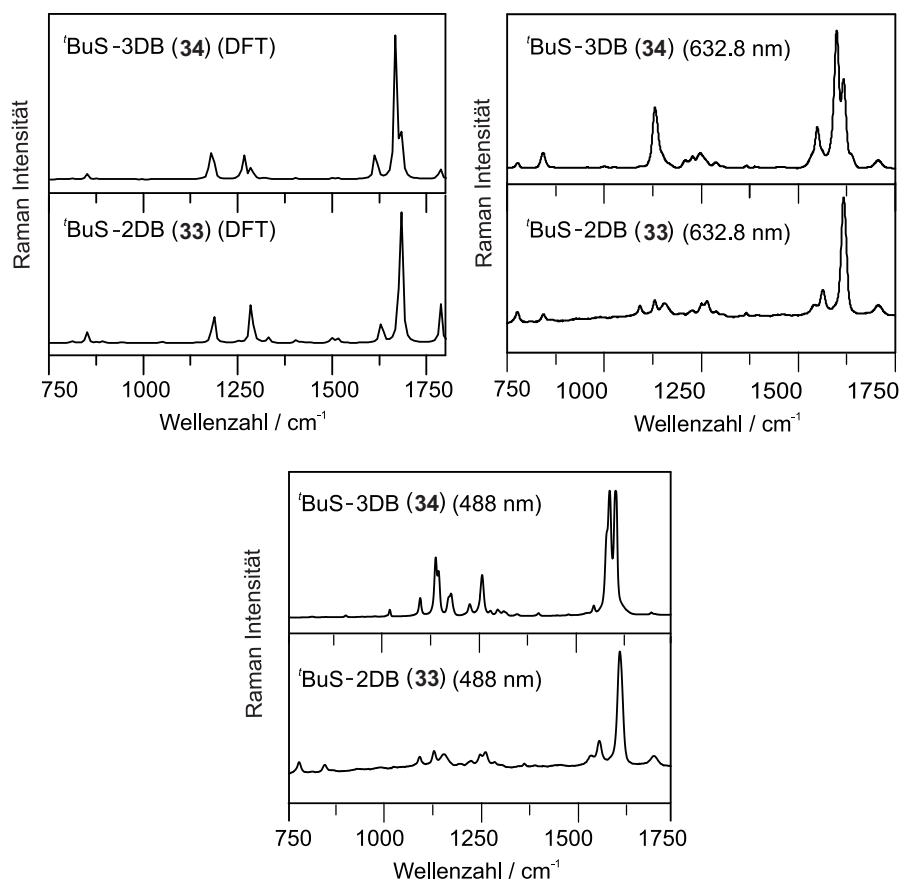


Abbildung 5.35: Raman-Spektren der vinylischen Polyene $t\text{BuS-2DB}$ (**33**) und $t\text{BuS-3DB}$ (**34**). Links oben: DFT berechnete Raman-Spektren; rechts oben: gemessene Raman-Spektren bei roter Laseranregung 632.8 nm, Integrationszeit 10 s, Leistung 100 μW ; Mitte unten: gemessene Raman-Spektren bei blauer Laseranregung 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 20 mW. Die Proben wurden als Pulver untersucht.

Tabelle 5.3: Raman-Bandenordnung für die vinylischen Polyene (**33**) und (**34**), (B3LYP/6-311G++(d,p), Skalierungsfaktor 0.97). ν_s symmetrische Streckschwingung, ν_a antisymmetrische Streckschwingung, δ_{def} Deformationsschwingung.

Zuordnung	DFT (33) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	DFT (34) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (33) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (34) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
ν_s C=O	1788	1785	1708	1606
ν_s C=C	1692	1668	1616	1591
ν_s C=C	1628	1615	1564	1548
ν_a C=C	1516			
ν_a C=C	1500			
δ_{def} CH	1286	1287	1265	1284
δ_{def} CH		1266	1252	1268
ν_s C-C	1188	1178	1158	1142
ν_a C-C			1129	1132
ν_s C-C			1093	1093
ν_s C-S	852	851	842	

5.7.4 SERS von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyenen auf AuNP-Filmen

Wie im Kapitel 5.7.1 vorgestellt wurde die SERS-Aktivität der vinylischen Polyene **29** und **30** unter Verwendung von AuNS und Au/Ag-Nanoschalen qualitativ nachgewiesen. Das Adsorptionsverhalten der *tert*-Butyl-geschützten vinylischen thiolierten Polyene **33** und **34** sollte quantitativ auf den Gold-Nanopartikelfilmen erprobt werden. Dazu wurden Objektträger, die zuvor mit einer 40 nm dicken Goldschicht über thermisches Verdampfen beschichtet wurden, mit dem jeweiligen Raman-Reporter inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen des AuNP-Kolloids (CTAB-stabilisierte, 53 nm) auf den Objektträger immobilisiert und im Ofen bei 30 °C getrocknet.

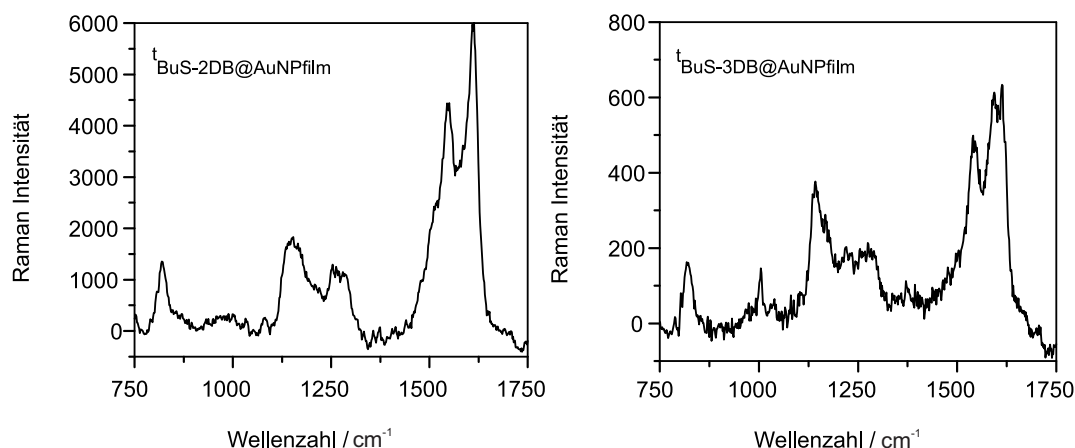


Abbildung 5.36: SERS-Experimenten mit AuNP@Au-Substraten. Links: SERS-Spektrum von *t*BuS-2DB (**33**), rechts: SERS-Spektrum von *t*BuS-3DB (**34**). Integrationszeit von 10 s, Leistung 900 μ W, Anregungswellenlänge von 632.8 nm.

Die basislinienkorrigierten SERS-Spektren sind in Abbildung 5.36 gezeigt. Reproduzierbare SERS-Beiträge wurden bei 1609 und 1547 cm^{-1} (symmetrischen C=C-Streckschwingung, Tab.5.3) und bei 1150 und 1262 cm^{-1} (symmetrische C-C-Streckschwingung, Tab.5.3) für das *t*BuS-2DB-Polyen (**33**) (Abbildung 5.36 links) detektiert. Für das *t*BuS-3DB-Polyen (**34**) (Abbildung 5.36 rechts) wurden Signale bei 1611, 1598, 1545 cm^{-1} (C=C-Streckschwingung) und 1141 cm^{-1} (C-C-Streckschwingung) erhalten. Beide SERS-Spektren weisen eine Bande bei 821 cm^{-1} auf, die der verschobenen C-S-Schwingung (Tab. 5.3) zugeordnet wurde. Da der C-S-Beitrag verstärkt wird, kann auf die Adsorption der Polyene auf der Metalloberfläche über den Schwefel geschlossen werden.

5.8 Absorption, Raman-Spektroskopie und SERS von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen

Experimentell konnten die linearen thiolierten Polyene durch die Einführung von *tert*-Butyl-Schutzgruppe am Schwefel und terminalen Phenylringe stabilisiert werden (Kapitel 5.6.3). In Abbildung 5.37 sind die synthetisierten phenylischen thiolierten Polyene dargestellt.

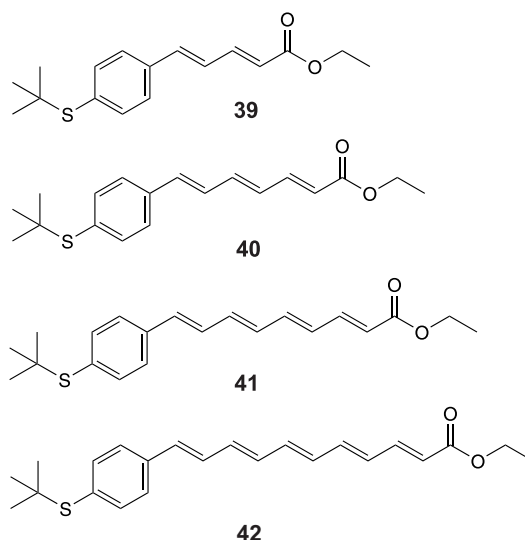


Abbildung 5.37: Synthetisierte phenylische thiolierte Polyene (**39**) *t*BuSPh-2DB, (**40**) *t*BuSPh-3DB, (**41**) *t*BuSPh-4DB, (**42**) *t*BuSPh-5DB.

5.8.1 Raman-spektroskopische Charakterisierung von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**)

In der Abbildung 5.38 links sind die gemessenen Raman-Spektren der thiolierten Polyene **39**, **40**, **41** und **42** gezeigt. Die Bandenzuordnung erfolgte mit Hilfe der DFT berechneten Raman-Spektren (Abbildung 5.38 rechts). Außerdem wurde die Arbeit von Schaffer^[135] zur Interpretation der Schwingungsspektren verwendet. Die simulierten Spektren weisen charakteristische Banden im Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} (C=C-Streckschwingung) und zwischen 900 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} (C-C-Streckschwingung) auf (Tab. 5.4). Des Weiteren ist eine Aufspaltung der Signale für die Polyene **39** und **40** im Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} zu beobachten. Die durchgeführten DFT-Rechnungen zeigten, dass diese Beiträge zwei C=C-Schwingungen zu zuordnen sind. So wurden für das Polyen **39** die Raman-Mode bei 1692 cm^{-1} der C=C-Doppelbindung an der Ester-Gruppe und die Bande bei 1644 cm^{-1} der C=C-Doppelbindung am Phenylring zugeordnet (Tab. 5.4). Die gleiche Bandenzuordnung erfolgte für das Polyen **40**. Experimentelle und computerunterstützte Daten zeigten das Verschwinden der zweiten C=C-Streckschwingungsmode mit zunehmender Kettenlänge. So ist für **41** eine Schulter bei 1644 cm^{-1} (Abbildung 5.38 rechts) zu beobachten, wohingegen für **42** eine Aufspaltung der Mode nicht mehr zu detektieren ist.

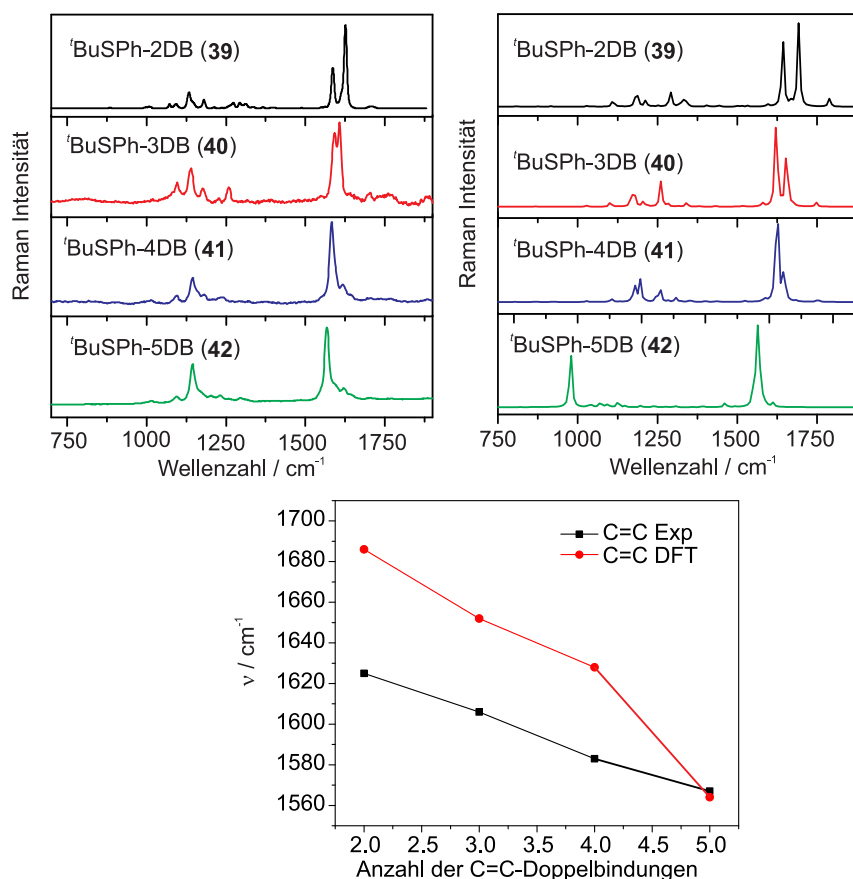


Abbildung 5.38: Links: Raman-Spektren der phenylischen Polyene (Feststoffe, Laserlichtwellenlänge 632.8 nm, Integrationszeit 5 s, Leistung 10 mW), rechts: DFT-berechnete Raman-Spektren (Gasphase, B3LYP-6311++ (d,p), Skalierungsfaktor 0.97), unten: Auftragung der Anzahl der C=C-Doppelbindungen gegen die Wellenzahlposition der C=C-Streckschwingung.

Des Weiteren ist eine Verschiebung der Schwingungsbanden zu kleineren Wellenzahlen mit zunehmender Kettenlänge zu erkennen (Abbildung 5.38 unten). Dies ist zu erwarten, denn bei längeren Polyenkette n gleichen sich die Bindungsabstände im Molekül aufgrund der steigenden Delokalisation der Elektronen aus. Es kommt zum Herabsetzen der Bindungsordnung von C=C-Doppelbindung und folglich zu einer Verschiebung der Frequenzen zu kleineren Wellenzahlen. Dies wurde von Kupka im Jahr 2016 ebenso gezeigt.^[136] Im Wellenzahlbereich zwischen 1000 cm⁻¹ und 1350 cm⁻¹ werden die Normalmoden für die C-C-Streckschwingung generiert (Tab. 5.4). Den DFT-berechneten Spektren (Abbildung 5.38 rechts) ist eine Rotverschiebung dieser Raman-Banden mit zunehmender Kettenlänge zu entnehmen: von 1292 cm⁻¹ für **39**, 1195 cm⁻¹ und 1178 cm⁻¹ für **40** und **41** und bis 980 cm⁻¹ für **42**. Experimentell lässt sich dieser Trend nicht messen.

Tabelle 5.4: Raman-Bandenordnung für die phenylischen Polyene (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**), (B3LYP/6-311G++(d,p)). ν_s symmetrische Streckschwingung, ν_a antisymmetrische Streckschwingung, δ_{def} Deformationsschwingung.

Zuordnung	DFT (39) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	DFT (40) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	DFT (41) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	DFT (42) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (39) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (40) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (41) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Exp (42) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
ν_s C=O	1788	1748	1756	1709	1704			
ν_s C=C	1686	1652	1644	1612	1627	1608	1621	1621
ν_s C=C	1644	1620	1628	1564	1586	1592	1582	1566
δ_{def} CH	1332	1260	1308	1460	1310	1262	1241	
δ_{def} CH	1292	1204	1260		1269			
ν_s C-C	1212	1172	1196	1124	1181	1178	1144	1142
ν_a C-C	1188	1100	1196	1068	1089	1096	1096	1096

Als nächstes wurden die Raman-Streuquerschnitte von **39**, **40**, **41** und **42** bei verschiedenen Wellenlängen untersucht. Abbildung 5.39 links zeigt die Raman-Spektren der Thiophenyl-modifizierte Polyene, die bei einer Anregungswellenlänge von 632.8 nm aufgenommen wurden. Die Spektren wurden auf das Ethanol-Signal bei 887 cm^{-1} normiert. Wie erwartet, steigt die Raman-Intensität mit zunehmender Kettenlänge, sodass das Polyen mit fünf Doppelbindungen **42** doppelt soviel Signal wie die Verbindung mit vier Doppelbindungen **41** liefert. Diese Messung bestätigt, dass sich der Streuquerschnitt des Moleküls mit zunehmender Kettenlänge vergrößert. Außerdem ist erneut die Verschiebung der Raman-Banden zu kleineren Wellenzahl zu beobachten. Die gleichen Proben wurden bei blauer Laseranregung (488 nm) vermessen (Abbildung 5.39 rechts).

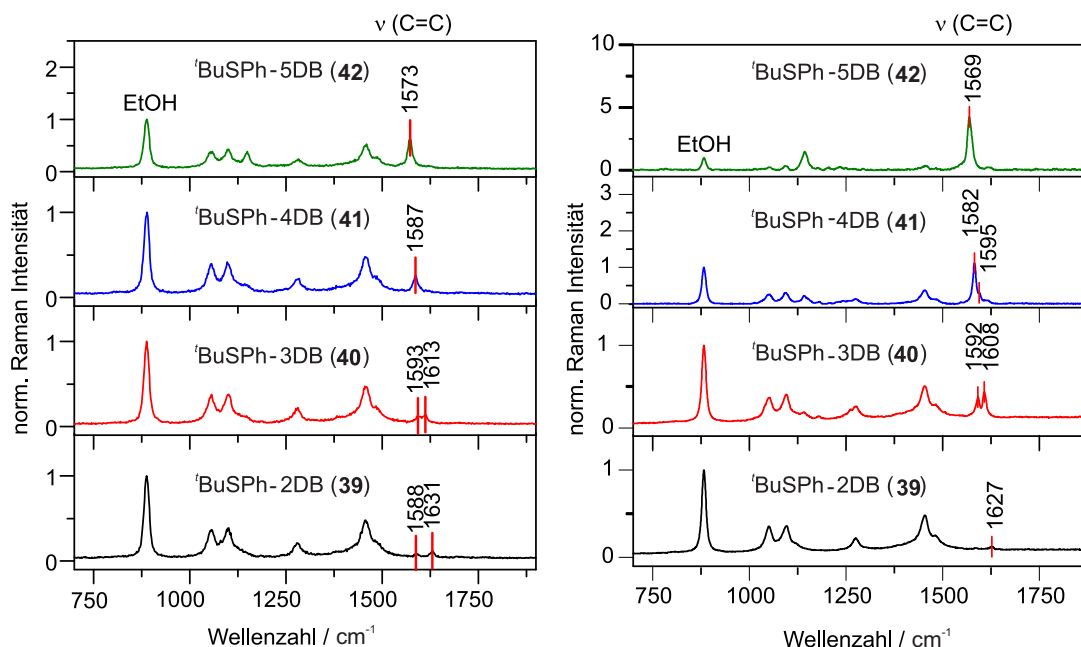


Abbildung 5.39: Normierte Raman-Spektren von 1 mM ethanolischen Lösung von phenylischen Polyenen **39**, **40**, **41** und **42**. Links: Laserlichtwellenlänge 632.8 nm, Integrationszeit 10 s, Leistung 12 mW, rechts: Laserlichtwellenlänge 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 20 mW.

Diese Messung zeigt ebenso, dass je größer das π -System (längere Kette des Polyens) um so mehr wird die Bande bei etwa 1600 cm^{-1} verstärkt. Bei den hier synthetisierten Verbindungen sind die π - π^* -Übergänge, ähnlich wie bei den Carotenoiden erlaubt. Fällt die Wellenlänge der

Laseranregung mit den elektronischen Übergängen des Moleküls zusammen, so wird das Molekül resonant angeregt. Das führt zu einer zusätzlichen Verstärkung von Schwingungsbanden. Deshalb kann die steigende Intensität der Raman-Banden abhängig von der Kettenlänge auf die Resonanzverstärkung zurückgeführt werden. In Abbildung 5.41 sind die Absorptionsspektren der phenylischen Polyene vorgestellt. Das Absorptionsmaximum von **42** ($\lambda_{max} = 410$ nm) liegt näher an der Resonanz (Anregungswellenlänge 488 nm) als von **41**, **40** oder **39**. Außerdem wurde eine Aufspaltung der C=C-Streckschwingungsmode für die kurzen phenylischen Polyene **37** und **39** detektiert.

Die Streuquerschnitte der Polyene sollten mit dem Streuquerschnitt von 4-MBA verglichen werden. *para*-Mercaptobenzoessäure (4-MBA) bildet selbstorganisierte Monolagen auf plasmonischen Metalloberflächen und eignet sich daher als Raman-Reporter für viele SERS-Experimente.^[137] In Abbildung 5.40 sind die detektierten, auf die Ethanol-Bande bei 887 cm^{-1} normierten Raman-Spektren gezeigt. Obwohl 4-MBA einen kleineren Raman-Streuquerschnitt aufweist, wiesen 4-MBA (pinke Linie) und **39** (schwarze Linie) vergleichbare Signalintensitäten auf. Für das thiolierte Polyen **40** (rote Linie) wurde etwa fünf mal mehr Signal als für 4-MBA (pinke Linie) und drei mal mehr als für das Polyen **39** detektiert. Während das Polyen mit vier Doppelbindungen **41** (blaue Linie) drei mal mehr Signal im Vergleich zu **40** liefert, wurde für das Polyen **42** (grüne Linie) vier mal mehr Signal als für das Polyen **41** detektiert. Die Gesetzmäßigkeit der steigenden Signalintensität mit zunehmender Kettenlänge wurde erneut bestätigt.

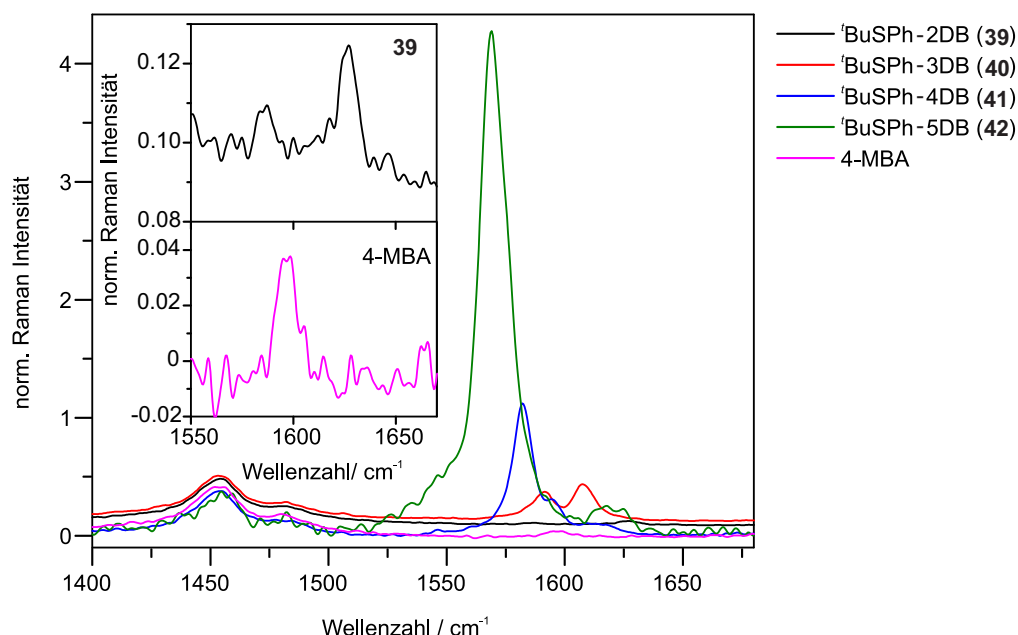


Abbildung 5.40: Normierte Raman-Spektren von 1 mM ethanolischen Lösung von phenylischen Polyenen **39**, **40**, **41** und **42** und 4-MBA. Laserlichtwellenlänge 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 10 mW.

5.8.2 Absorptionsspektren von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**)

Verbindungen mit Mehrfachbindungen absorbieren die elektromagnetische Strahlung durch die Übergänge der π -Elektronen. Dabei wird eine Verschiebung der Absorption in den längerwelligen Spektralbereich (Rotverschiebung) beobachtet. So erscheinen beispielsweise Verbindungen, die

konjugierte Doppelbindungen enthalten, farbig. In konjugierten Systemen liegen die π -Elektronen delokalisiert vor. Die Delokalisierung der Elektronen führt zu einer Senkung der Energie von π^* -Orbitalen und schwächt den antibindenden Charakter ab. Als Konsequenz wird eine Rotverschiebung der Absorptionsmaxima beobachtet, da die π - π^* -Zustände energetisch näher aneinander liegen. Mit Hilfe der durchgeführten DFT-Rechnungen konnte die Verschiebung der Absorption zu größeren Wellenlängen in Abhängigkeit von der Kettenlänge für die synthetisierten Thiophenyl-modifizierten Polyene mit zwei **39**, drei **40**, vier **41** und fünf Doppelbindungen **42**, vorhergesagt werden (Abbildung 5.41 oben).

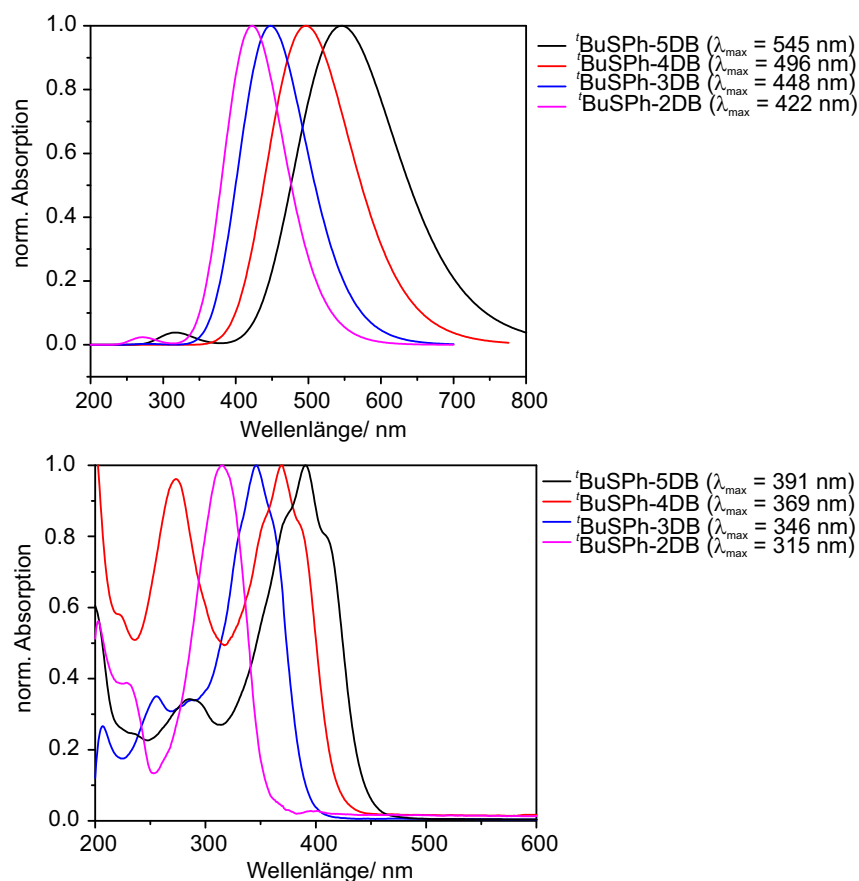


Abbildung 5.41: Oben: simulierten Absorptionsspektren der phenylischen Polyene **39** ($^t\text{BuSPh-2DB}$), **40** ($^t\text{BuSPh-3DB}$), **41** ($^t\text{BuSPh-4DB}$) und **42** ($^t\text{BuSPh-5DB}$), unten: Absorptionsspektren von $10 \mu\text{M}$ ethanolischen Lösungen.

Die Rotverschiebung der Absorption dieser Polyene wurde ebenso experimentell gezeigt (Abbildung 5.41 unten). Außerdem ist der Abbildung 5.41 zu entnehmen, dass jedes Spektrum mindestens eine zweite Absorptionsbande (249 nm für **39**, 210 nm und 260 nm für **40**, 230 nm und 270 nm für **41**, 240 nm und 290 nm für **42**) aufweist. Hierbei kann es sich um die energiereicheren Elektronenübergänge, wie σ - σ^* , die im ultravioletten Bereich (200-400 nm) absorbieren, handeln. Des Weiteren ist erkennbar, dass die Differenz zwischen den Absorptionsmaxima ab drei Doppelbindungen kleiner wird. Dies bestätigt den Trend der verringerten Rotverschiebung in Abhängigkeit von der Kettenlänge. Die Vergrößerung des konjugierten π -System führt dazu, dass die C-C-Einfachbindung mehr und die C=C-Doppelbindung weniger den Charakter einer Doppelbindung besitzt. Somit werden sich zwei Arten von Bindungen ähnlich und daraus resultiert, dass mit zunehmender Kettenlänge die bathochrome Verschiebung kleiner wird. Der Effekt der wachsenden Kettenlänge konnte ebenso an der Farbe von leicht gelblich (drei DB) bis dunkelgelb (fünf

DB) der Polyene (Pulver) festgestellt werden.^[135]

5.8.3 SERS von *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten phenylischen Polyenen (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**)

Die SERS-Aktivität der phenylischen Polyene wurde mit Gold-Nanosternen erprobt. Dazu wurden die gleiche Konzentration der AuNS mit **39**, **40**, **41** und **42** (1 mM in Ethanol) inkubiert und mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Um die plasmonische Verstärkung der verwendeten AuNS mit $\lambda_{max}=682$ nm (Abbildung 5.42) optimal zu nutzen, wurden die Spekten bei den Anregungswellenlänge von 632.8 nm (Abbildung 5.43 rechts) und 785 nm (Abbildung 5.43 links) gemessen.

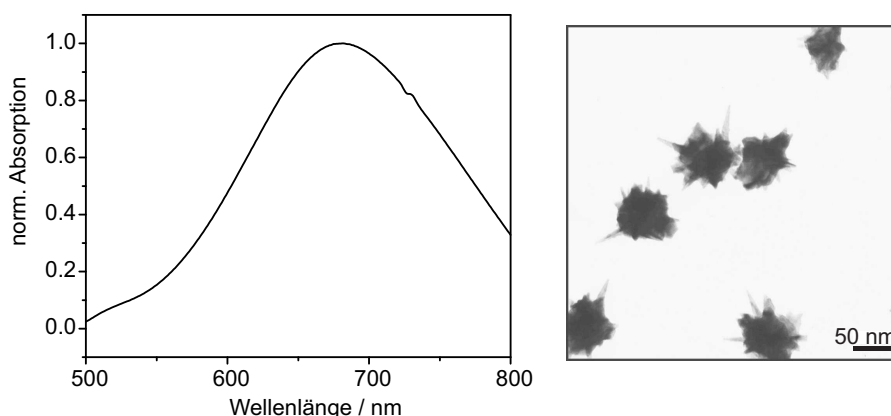


Abbildung 5.42: Links: normiertes Extinktionsspektrum der AuNS, rechts: TEM-Aufnahme der für die SERS-Experimente verwendeten AuNS.

In den SERS-Spektren für die Anregungswellenlänge von 785 nm (Abbildung 5.43 links) sind vier Beiträge erkennbar: 1580 cm^{-1} C=C-Valenzschwingung, 1100 cm^{-1} C-C-Streckschwingung, 1190 cm^{-1} und 1340 cm^{-1} Phenylring. Obwohl die vier Polyene unterschiedliche Raman-Streuquerschnitte haben, ist das SERS-Signal bei 1580 cm^{-1} (C=C-Streckschwingung) für Raman-Reporter **40**, **41** und **42** vergleichbar intensiv. Für das Polyene mit zwei Doppelbindungen **39** (schwarze Linie) ist dieser Raman-Beitrag um 1.5-fache intensiver als bei **41** (blaue Linie). Bei dem Experiment mit roter Laseranregung (632.8 nm) wurden die SERS-Spektren mit dem gleichen Trend detektiert. Die Schwankungen der Signalintensitäten können auf das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der Raman-Reporter zurückgeführt werden. Es ist zu vermuten, dass aufgrund der Größe mehr Polyenmoleküle mit zwei Doppelbindungen **39** auf der Metalloberfläche als Polyenmoleküle mit längeren Ketten adsorbierten. Das maximale SERS-Signal wird nur nach der Ausbildung einer selbstorganisierten Monolage detektiert. **39** kann vermutlich bessere Monolagen ausbilden als die drei anderen Raman-Reporter, was die Signalintensität erklären kann. Geht man jedoch davon aus, dass alle vier untersuchten phenylischen thiolierten Polyene nur Submonolagen auf dem verwendeten SERS-Substrat ausbilden, dann können die Differenzen in den Signalintensitäten auf den unterschiedlichen Aggregationszustand von AuNS zurückgeführt werden. Dies erschwert einen fairen Vergleich von Signalintensitäten der hergestellten Polyene.

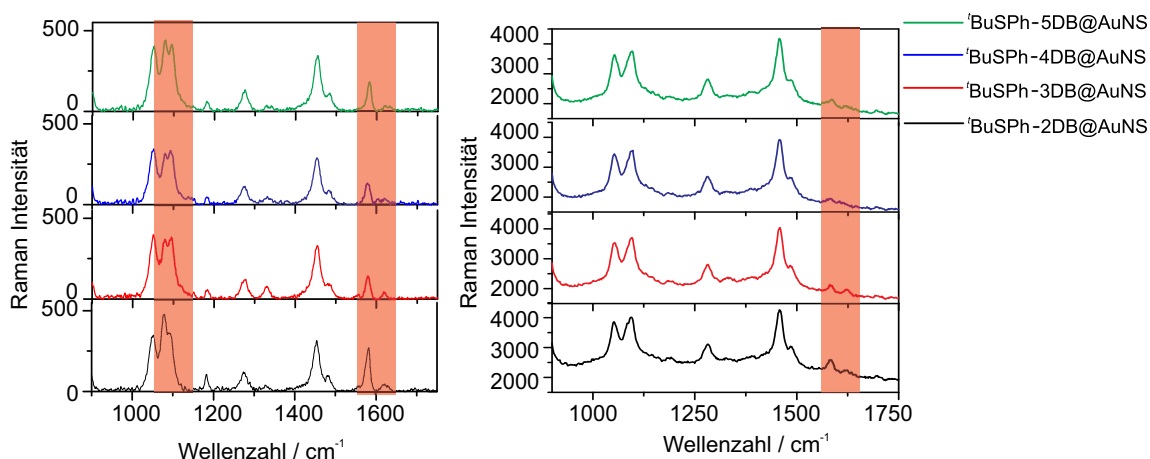


Abbildung 5.43: Links: SERS-Spektren der phenylischen Polyene **39** (*t*BuSPH-2DB), **40** (*t*BuSPH-3DB), **41** (*t*BuSPH-4DB) und **42** (*t*BuSPH-5DB) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm, Integrationszeit 120 s, Leistung 100 mW; rechts: SERS-Spektren von **39** (*t*BuSPH-2DB), **40** (*t*BuSPH-3DB), **41** (*t*BuSPH-4DB) und **42** (*t*BuSPH-5DB) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 632.8 nm, Integrationszeit 20 s, Leistung 12 mW.

5.9 Synthese von dithiolierten Polyenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthesen zur Herstellung von dithiolierten Polyenen durchgeführt. Die Polyene können für die Synthese von SERS-aktiven Nanopartikel-Dimeren eingesetzt werden. Durch die terminalen Thiolgruppen können diese Polyene zur Verbrückung von zwei Nanopartikeln, sowie als Raman-Reporter (konjugiertes π -System) verwendet werden. Des Weiteren können diese Moleküle in der molekularen Elektronik^[81] eingesetzt werden.

5.9.1 Synthese von Acetyl-geschützten dithiolierten vinylischen Polyenen

Die monothiolierten Polyene konnten mittels einer nucleophilen Substitution an vinylischen Halogeniden erfolgreich synthetisiert werden (Kapitel 5.6.2). Dieselbe Synthesemethode sollte für die Herstellung von dithiolierten Polyenen ausprobiert werden.

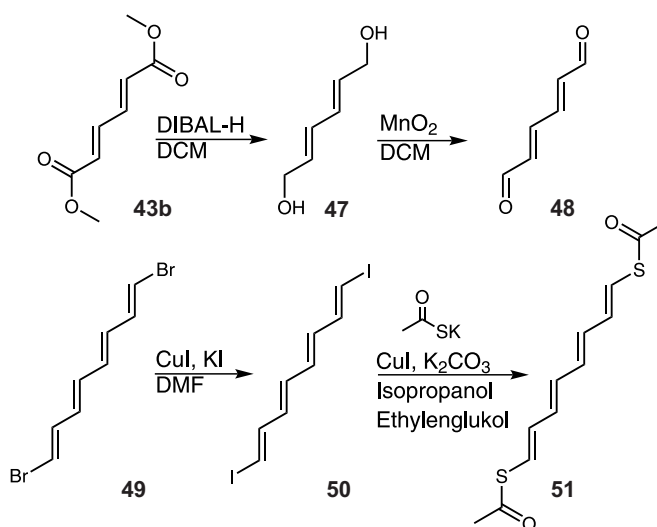


Abbildung 5.44: Syntheseschritte für die Herstellung des dithiolierten Acetyl-geschützten Polyens (**51**).

In Abbildung 5.44 ist beispielhaft die Synthese von dithiolierem Polyen (**51**) mit vier Doppelbindungen gezeigt. Der Alkohol **47** wurde mittels einer DIBAL-H-Reduktion von **43b** mit 66% Ausbeute synthetisiert. Durch eine Mangan(II)-oxid-Oxidation wurde der Aldehyd **48** mit 75% Ausbeute erhalten und konnte für die Wittig-Reaktion zu dem bromierten Tetraen **49** eingesetzt werden. Die nucleophile Substitution mit **49** lieferte nicht das gewünschte Produkt **51**. Daraufhin wurde die Halogen-Austauschreaktion zu **50** ausprobiert, um die Reaktivität des Vinylhalogenids zu steigern. Liu konnte die Umhalogenierung mit 82% Ausbeute durchführen.^[138] Bei der Umhalogenierung zu **50** konnte eine Ausbeute von 72% erzielt werden. Die Kupfer-katalysierte nucleophile Substitution unter Verwendung von Ethylenglukol und Kaliumcarbonat^[139] führte nicht zu der gewünschten Zielverbindung **51**.

5.9.2 Synthese von *tert*-Butyl-geschützte dithiolierte vinylichen Polyenen

Wie zuvor gezeigt eignet sich die *tert*-Butyl-Schutzgruppe für die Stabilisierung der Polyenkette besonders gut. Die Syntheseroute (Abbildung 5.45) wurde für die Herstellung von *tert*-Butyl-geschützten dithiolierten Polyenen ausgearbeitet. Die Synthese von **52** erfolgte durch die Oxidation von **32a** (Kapitel 5.6.1) mit Mangan(II)-oxid. Die Umsetzung von **52** mit (Iodomethyl)-triphenylphosphoniumiodid lieferte das Produkt **53** in 37% Ausbeute. Die Reaktion von *tert*-Butylmercaptan mit **53** lieferte **54** in 25% Ausbeute.

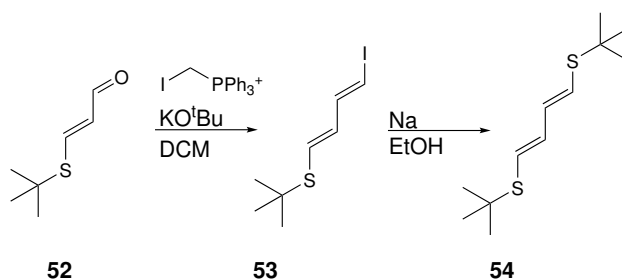


Abbildung 5.45: Synthese des dithiolierten *tert*-Butyl-geschützten Polyens (**54**).

5.9.3 Synthese von dithiolierten phenylischen Polyenen mittels Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion

Die Abbildung 5.46 illustriert die Synthesen des nicht-symmetrischen Polyens **61** und des symmetrischen Polyens **62** mittels Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion.

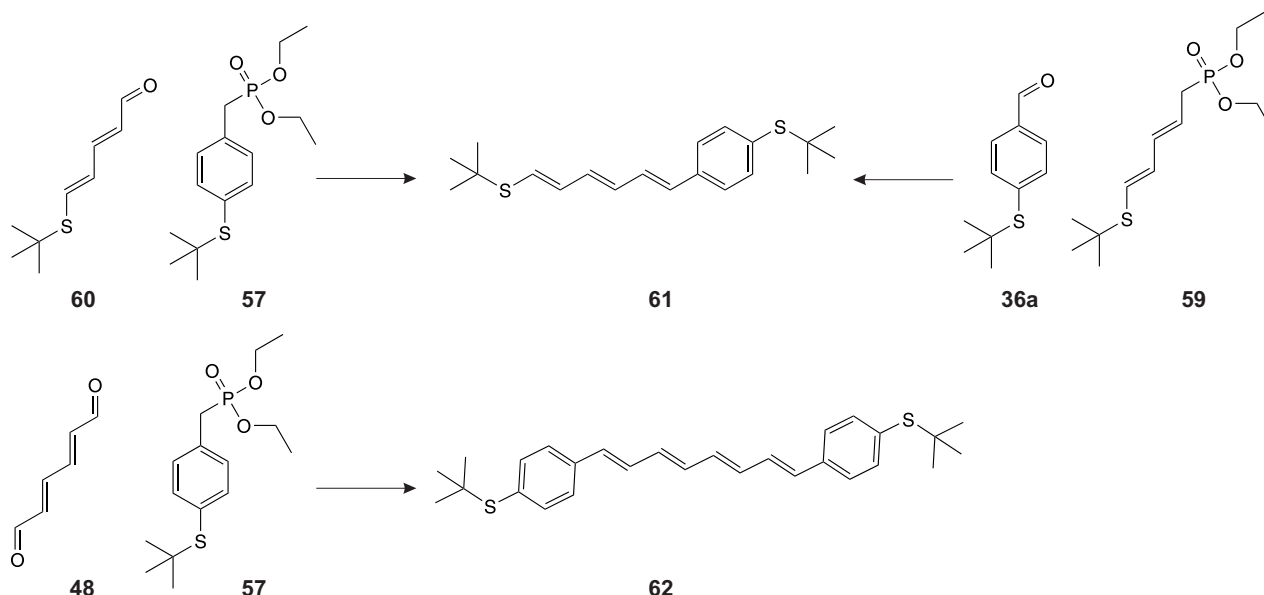


Abbildung 5.46: Syntheseübersicht für die Herstellung von dithiolierten *tert*-Butyl-geschützten Polyenen (**61**) und (**62**) mittels Horner-Emmons-Reaktion.

Zunächst wurden die HWE-Reagenzien **57** und **59** synthetisiert (Abbildung 5.47). **57** wurde ausgehend vom 1-Brommethyl-4-(*tert*-butylthio)phenyl (**56**) durch eine Arbuzov-Reaktion mit einer Ausbeute von 53% erhalten. Die Umsetzung von ((1*E*,3*E*)-5-Brompenta-1,3-dien-1-yl)(*tert*-butyl)sulfan (**58**) mit Triethylphosphit lieferte den entsprechenden Phosphorsäureester **59** mit 5% Ausbeute. Für die Synthese des nicht-symmetrischen Polyens (**61**) wurde **57** mit Natriumhydrid bei -78 °C versetzt. Anschließend wurde **60** zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur weitergerührt. Dieser Ansatz lieferte nicht das gewünschte Produkt **61**. Ebenso konnte die Reaktion von **57** mit dem Dialdehyd **48** zu dem symmetrischen Polylen (**61**) nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Reaktion des phenylischen Phosphonates **57** mit Natriumhydrid läuft oft sehr langsam ab, ermöglicht jedoch die Bildung eines stabilen Carbanions. Erhöhte Temperaturen führen oft zu einer Zersetzung eines solchen Carbanions. Wadsworth und Emmons zeigten, dass solche Phosphonate mit Natriumhydrid zu dem entsprechenden Carbanion in Abwesenheit des jeweiligen Aldehyds oder Ketons nicht reagieren.^[140] Der gleiche Reaktionsablauf wurde von Thomas und Boutagy beobachtet.^[141]

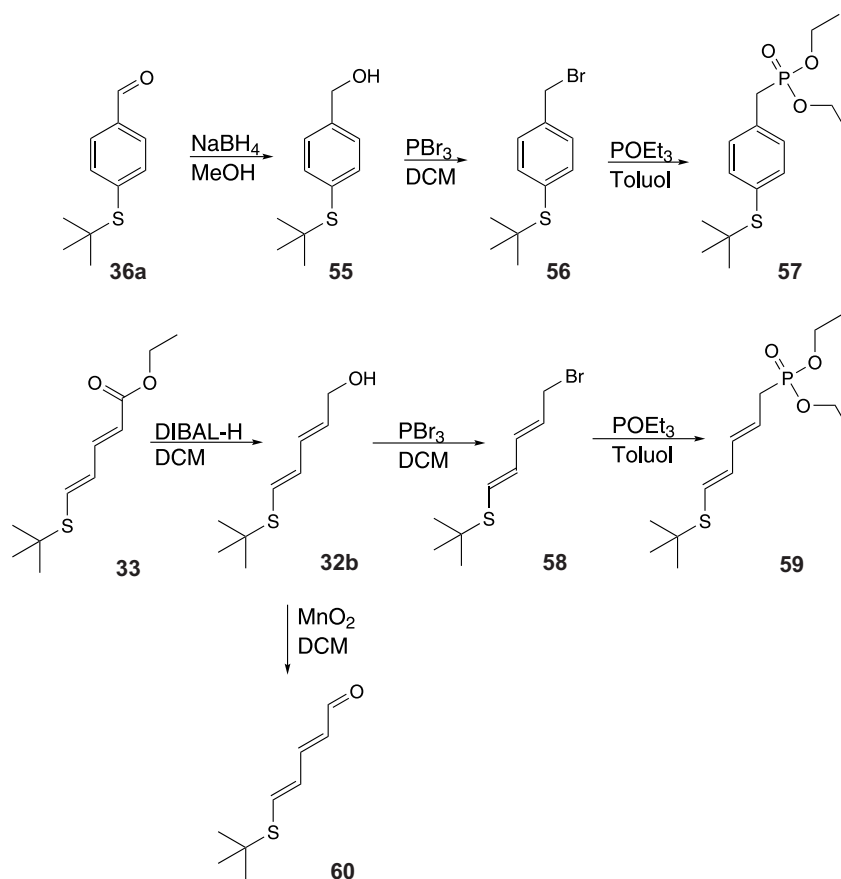


Abbildung 5.47: Synthesen von Methyl-(2E,4Z)-6-(diethoxyphosphoryl)hexa-2,4-dienoat (**59**) und Diethyl-(4-(*tert*-butylthio)benzyl)phosphonat (**57**).

Im Jahr 2012 präsentierten Meisner die Synthese von Stilben-ähnlichen Polyenen.^[80] Nach diesem Protokoll wurde zuerst ein phenylisches Phosphonat zusammen mit einem Aldehyd vorgelegt und dann langsam mit Kalium-*tert*-butanolat umgesetzt. Dies lässt vermuten, dass die Umsetzung zu **61** durch das Ändern des Durchführungsprotokolls verbessert werden kann. Hierfür sollte das Vorlegen der Edukte und eine langsame Umsetzung der Reaktionsmischung mit Natriumhydrid, oder Kalium-*tert*-butanolat ausprobiert werden. Oft werden Wadsworth-Emmons-Reaktionen unter Verwendung von sterisch anspruchsvollen und starken Basen, wie LDA oder *n*-BuLi durchgeführt.^[142] Die Methode wurde bei der Umsetzung von **57** mit dem Dialdehyd **48** ausprobiert. Jedoch lieferte auch dieser Ansatz nicht das Produkt **62**. Die Umsetzung von 4-(*tert*-Butylthio)-benzaldehyd (**36a**) mit dem vinylic Phosphonat **59** und Natriumhydrid führte nicht zu dem nicht-symmetrischen Polyen (**61**).

5.9.4 Dimer-Assemblierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthesen zur Herstellung von dithiolierten Polyenen ausprobiert (Kapitel 5.9). Jedoch lieferten die erprobten Ansätze nicht das gewünschte Produkt. Aus diesem Grund wurden für die Assemblierung der Dimere 1,8-Octandithiol und Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoat (**33**), sowie CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) stabilisierte Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 50 ± 2.5 nm verwendet. Die Verknüpfung von zwei Nanopartikeln wurde mit 1,8-Octandithiol als Brückenmolekül erprobt. Der Raman-Reporter **33** wurde kovalent über die endständige Thiolgruppe auf der Oberfläche des Nanopartikels gebunden (Abbildung 5.48 unten links). Auf diese Weise befindet sich **33** in einem heißen Punkt (engl. *hot spots*) des Dimers und eine maximale Verstärkung des Raman-Signals von **33** wird erreicht.

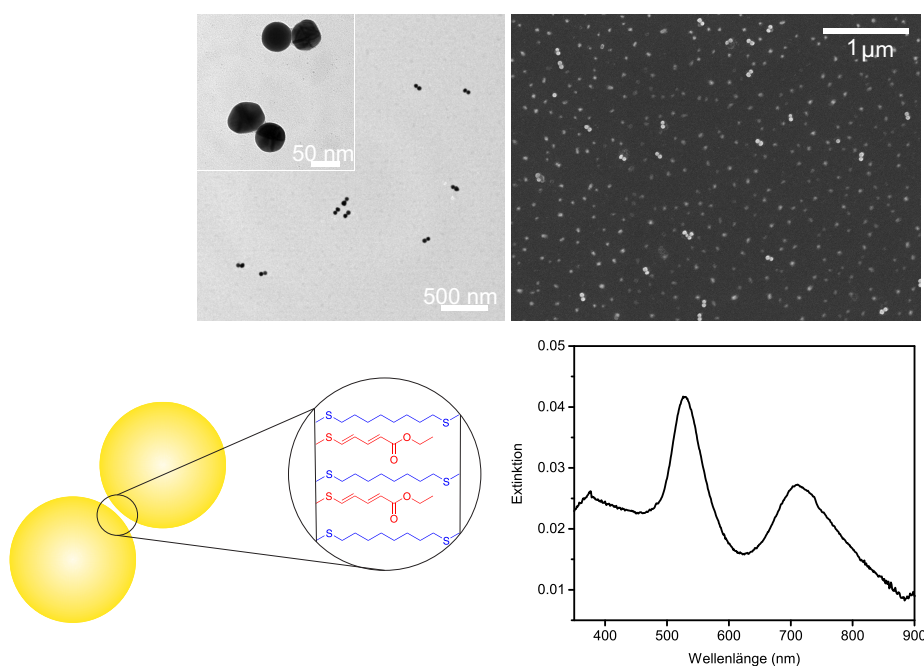


Abbildung 5.48: Oben links: Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahme der AuNP-Dimere verbrückt über dual-SAM aus 1,8-Octandithiol und Polyen **33** auf Kupfernetz mit Kohlenstofffilm. Oben rechts: Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme der AuNP-Dimer Probe auf Glas, besputtert mit 2 nm Pt (helle Stippen im REM-Bild. Unten links: Darstellung der *hot spots* der synthetisierten Dimere mit 1,8-Octandithiol als Kopplungsmolekül (blau) und **33** als Raman-Reporter (rot). Unten rechts: Normiertes Extinktionsspektrum der Goldnanopartikel-Dimere, gemessen in einem Bereich von 350 bis 900 nm. Die Extinktionsmaxima der Nanostrukturen liegen bei $\lambda_{max,tra} = 527$ nm und $\lambda_{max,lon} = 711$ nm.

In Abbildung 5.48 unten rechts ist das gemessene und normierte UV/Vis-Extinktionsspektrum der Goldnanopartikel-Dimere dargestellt. Die beiden Extinktionsmaxima bei den Wellenlängen $\lambda_{max} = 527$ nm und $\lambda_{max} = 711$ nm sind deutlich zu erkennen. Das Extinktionsmaximum bei $\lambda_{max} = 527$ nm steht für die Anregung der Plasmonenbande in transversaler Richtung. Das zweite gemessene Extinktionsmaximum bei $\lambda_{max} = 711$ nm beschreibt dagegen die Anregung in longitudinaler Richtung. Bei ungekoppelten Nanopartikeln lässt sich nur die transversale Plasmonenresonanz beobachten. Das erhaltene Spektrum ist daher typisch für Goldnanopartikel-Dimere. Anhand der TEM-Aufnahmen (Abbildung 5.48 oben links) lassen sich Aussagen über die Grösse, Form und Stabilität der Nanostrukturen treffen. Die Nahaufnahme zeigt, dass die Partikel eine sphärische

Form besitzen und sich Dimere ausgebildet haben. Die einzelnen Partikelgrößen liegen in einer Größenordnung von 50 nm vor. Auf dem Übersichtsbild lassen sich mehrere einzelne Dimere mit gleicher Form erkennen. Diese Aufnahmen zeigen, dass beim Ablösen der Nanostrukturen von dem Glasträger keine Agglomerate entstanden sind. Für die Feststellung der Ausbeute wird die Aufnahme des Rasterelektronenmikroskops verwendet. Die Ausbeute an Dimeren kann auf 80 bis 90% geschätzt werden. Somit konnte die erfolgreiche Synthese der Nanopartikel-Dimere nachgewiesen werden.

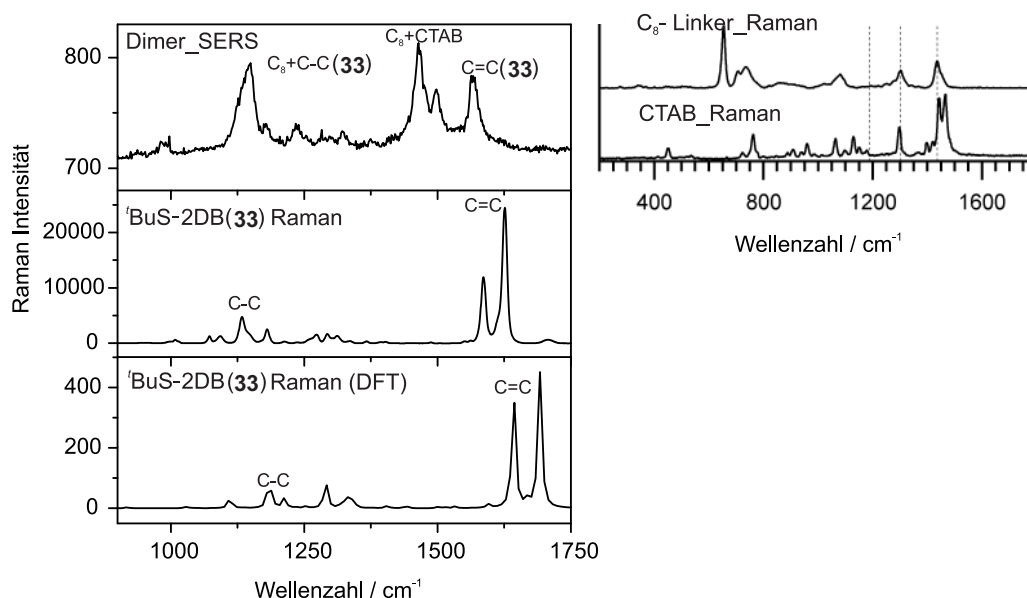


Abbildung 5.49: Links oben: Aufgenommenes SERS-Spektrum (10 s Integrationszeit, Laserleistung $30 \mu\text{W}$, 100-fache Vergrößerung). Links Mitte: Raman-Spektrum (10 s Integrationszeit, Laserleistung $30 \mu\text{W}$, 100-fache Vergrößerung). Links unten: theoretisch berechnetes Raman-Spektrum von **33**. Rechts oben: Raman-Spektren von 1,8-Octandithiol (C_8) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).

In einem SERS-Experiment wurde die Anbindung von **33** an die Dimere untersucht. Abbildung 5.49 präsentiert das simulierte Raman-Spektrum des Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoats (**33**) (unten), das experimentell erhaltene Raman-Spektrum des Polyen **33** (Mitte) und das SERS-Spektrum von **33** (oben). Für eine eindeutige Zuordnung der Raman-Banden wurden die Raman-Spektren des C_8 -Linkers (1,8-Octandithiol) und des CTAB-Stabilisators zum Vergleich herangezogen (Abbildung 5.49 rechts). So wurde die Raman-Mode bei 1147 cm^{-1} der C-C-Streckschwingung von C_8 -Linker und Polyen **33** zugeordnet (Abbildung 5.49 oben rechts). Die Moden bei ca. 1464 und 1494 cm^{-1} wurden als Schwingungen von C_8 -Linker und CTAB-Stabilisator identifiziert. Die Raman-Bande bei 1566 cm^{-1} wurde der C=C-Streckschwingung von **33** zugeordnet. Dabei konnte eine Rotverschiebung der Normalmode um ca. 20 cm^{-1} beobachtet werden.

5.10 Zusammenfassung Polyen-Raman-Farbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Acetyl-geschützten monothiolierten vinylischen Polyene **29** mit 90% und **30** mit 15% Ausbeute synthetisiert. Die Synthesen konnten mittels einer nucleophilen Substitution an einem sp^2 -Kohlenstoff unter Abspaltung eines Iodids erfolgreich durchgeführt werden. Die Stabilität der Polyen-Ketten wurde durch die Einführung einer *tert*-Butyl-Schutzgruppe am Schwefel verbessert. Wobei die Ausbeuten der Zielsubstanzen **33** (90%) und **34** (60%) optimiert wurden, indem zuerst vinylischen Polyenkette mit terminalem Iodid **27** und **28** synthetisiert und zum Schluss die *tert*-Butyl-geschützte Thiolgruppe eingeführt wurde.

Des Weiteren wurden monothiolierten phenylischen Polyene **39**, **40**, **41** und **42** ausgehend von 4-(*tert*-Butylthiol)benzaldehyd (**36a**) erfolgreich synthetisiert. Mithilfe einer Kombination aus DIBAL-H-Reduktion und Mangan(II)-oxid-Oxidation & Wittig-Reaktion konnten Polyen-Ketten bis fünf Doppelbindungen verlängert werden.

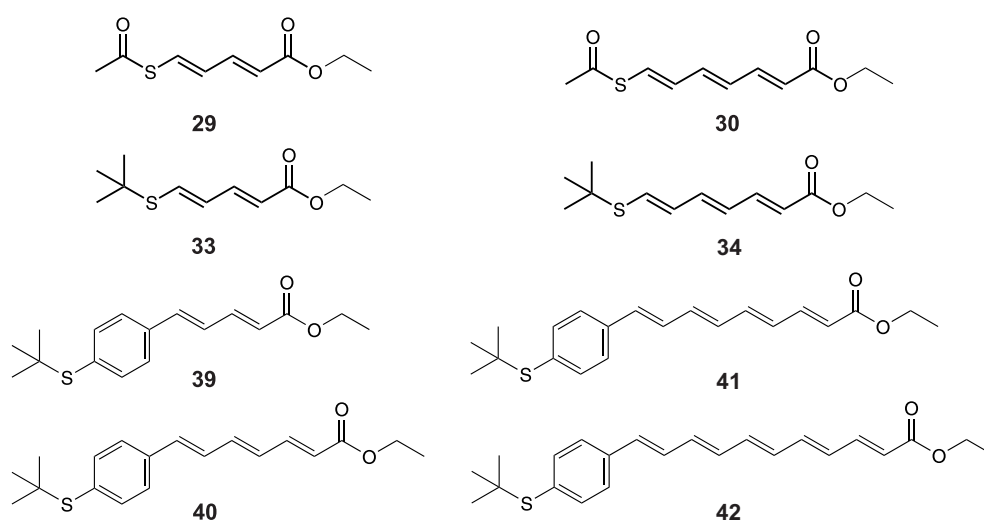


Abbildung 5.50: Synthetisierte thiolierte Polyene

Um die Polyen-Kette um mehr als eine Doppelbindung pro Reaktionsschritt zu verlängern, wurde Horner-Wadsworth-Emmons-Reagenzien **46** hergestellt. Die Umsetzung von **46** mit beispielsweise **36a** lieferte nicht das gewünschte Produkt **40**. Wie im Kapitel 5.6.3 schon erwähnt, kann diese Synthesemethode durch die Verwendung einer starken und sterisch anspruchsvollen Base wie LDA, *n*-BuLi oder NaHMDS verbessert werden.

Außerdem wurden die optischen und spektroskopischen Eigenschaften der Polyene **29**, **30**, **33** und **34** untersucht. Eine konzentrationsabhängige Raman-Messung zeigte, dass **29** einen größeren Streuquerschnitt als 4-MBA hat. Des Weiteren wurden Schwingungsspektren für **33**, **34**, **39**, **40**, **41** und **42** mittels DFT simuliert. Die experimentell gemessenen Raman-Spektren stimmen gut mit den computerberechneten Spektren überein und weisen zwei dominante Banden auf, die den symmetrischen C=C- und C-C-Streckschwingungsmoden zugeordnet wurden. Bei den C=C-Beiträgen wurde eine Aufspaltung der Signale bei Blauverschiebung der Anregungswellenlänge detektiert (Kapitel 5.7). Für den Vergleich der Raman-Streuquerschnitte von vinylischen Polyenen **33** und **34** und phenylischen Polyenen **39**, **40**, **41** und **42** wurde die Anzahl der Doppelbindungen gegen die normierten Raman-Signalintensitäten der C=C-Streckschwingung (Abbildung 5.51 oben) aufgetragen. Bei den phenylischen Polyenen wurde die Kettellänge ohne den Phenylring berücksichtigt.

5 Ergebnisse und Diskussion

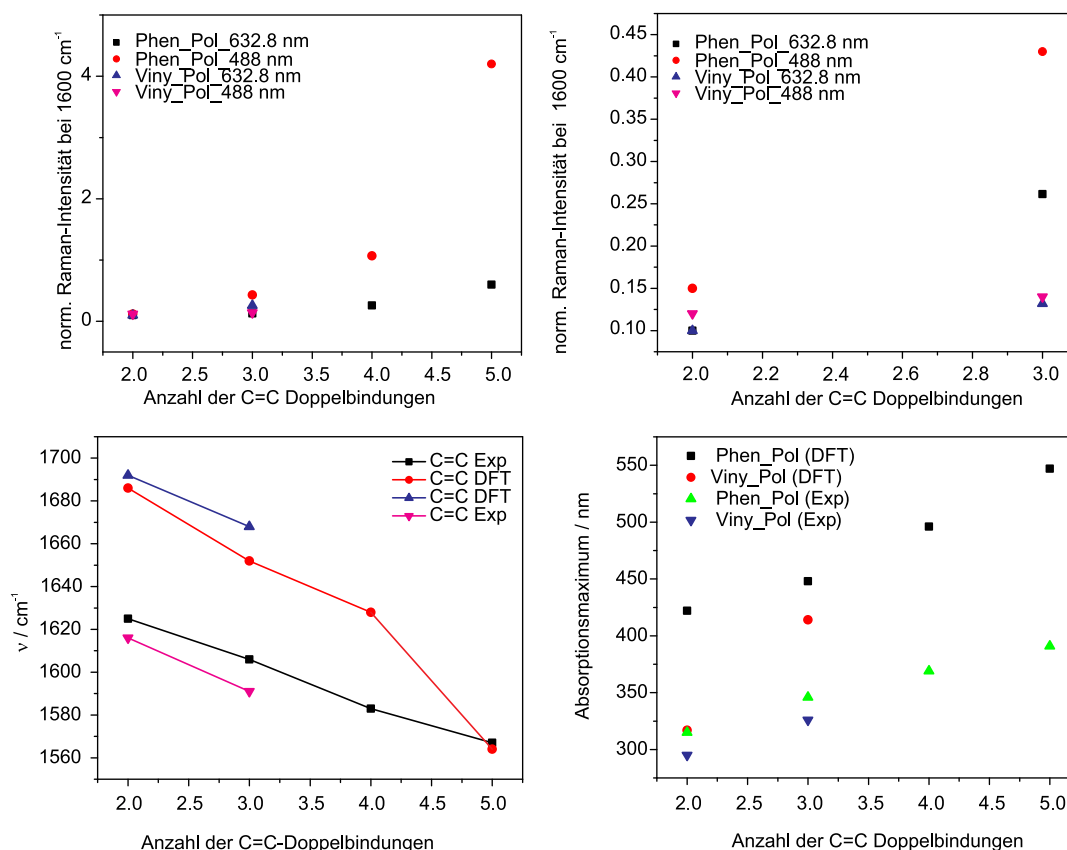


Abbildung 5.51: Links oben: Auftragung der Raman-Intensitäten der C=C-Streckschwingung bei ca. 1600 cm^{-1} aller synthetisierten Polyene **39**, **40**, **41** und **42** gegen die Anzahl der Doppelbindung.

Rechts oben: Ausschnitt der Auftragung von Raman-Signalintensitäten der C=C-Streckschwingung bei ca. 1600 cm^{-1} für die vinylischen und phenylischen Polyene mit zwei und drei Doppelbindungen. Die Spektren sind auf die 887 cm^{-1} Bande von Ethanol normiert und bei zwei Laseranregungswellenlängen von 488 nm und 632.8 nm vermessen. Links unten: Auftragung der Raman-Signalverschiebung der C=C-Streckschwingung gegen die Anzahl der C=C-Doppelbindungen. Rechts unten: Auftragung der Absorptionsmaxima der synthetisierten Polyene gegen die Anzahl der Doppelbindungen. Für die phenylischen Polyene **39**, **40**, **41** und **42** wird die Anzahl der Doppelbindungen ohne Berücksichtigung des Phenylrings betrachtet.

Die Raman-Experimente bei der Anregungswellenlänge von 632.8 nm zeigten, dass eine Erweiterung des π -Systems durch einen Phenylring zur Verstärkung der Raman-Signale führt (Abbildung 5.51 links oben, schwarze und blaue Punkte). Die bei blauer Laseranregung (488 nm) generierten Raman-Intensitäten weisen ebenso eine Verbesserung der Raman-Signale aufgrund der Vergrößerung des Raman-Streuquerschnittes durch den Phenylring (Abbildung 5.51 links oben, pinke und rote Punkte) auf. Außerdem wurde eine Verschiebung der Raman-Banden zu kleineren Wellenzahlen mit zunehmenden Molekülmasse nachgewiesen (Abbildung 5.51 links unten).

Die Rotverschiebung der Absorptionsmaxima mit zunehmender Kettenlänge wurde experimentell und anhand der simulierten Spektren (DFT) für die *tert*-Butyl-geschützten thiolierten Polyene gezeigt (Abbildung 5.51). Beispielsweise führt die Erweiterung der vinylischen Polyen-Kette mit zwei Doppelbindungen **33** um einen Phenylring **39** zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums um 25 nm (Abbildung 5.51 rechts unten, blaue und grüne Dreiecke). Wird die vinylische

Polyenkette mit drei Doppelbindungen **34** durch einen Phenylring **40** verlängert, so wird eine bathochrome Verschiebung um 21 nm beobachtet (Abbildung 5.51 rechts unten, blaue und grüne Dreiecke). Die Verringerung der Rotverschiebung mit steigender Kettenlänge ist für die in dieser Arbeit vorgestellten Polyen-Ketten noch nicht deutlich erkennbar. Für viele literaturbekannte Polyen-Derivate wird dieser Trend erst ab sechs Doppelbindungen signifikant.^[143, 144]

Die SERS-Aktivität von **29** und **30** wurde mit AuNS und Au/Ag-Nanoschalen mittels oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie erfolgreich untersucht (Kapitel 5.7.1). In einem weiteren SERS-Experiment wurde ein AuNP@Au-Film als SERS-Substrat eingeführt. Dabei wurden alle charakteristischen Schwingungsmoden der Polyene **33** und **34** reproduzierbar detektiert. Die Adsorption der Raman-Reporter auf dem SERS-Substrat erfolgte über die Gold-Schwefel-Bindung, da die Raman-Mode bei 821 cm^{-1} (C-S-Schwingung) verstärkt wurde.

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von phenylischen thiolierten Polyenen (**39**), (**40**), (**41**) und (**42**) wurden Au-Nanosterne verwendet. Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Farbstoffe ohne Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe auf der Gold-Oberfläche adsorbieren.

Zum Vergleich der Streuquerschnitte bedarf es weitere Experimente mit einem homogenen SERS-Substrat. Dazu sind monodisperse Kolloide, wie Kern-Satelliten-Strukturen denkbar, die durch Verkapselung oder Stabilisierung mit einer Polymerschicht stabilisiert werden müssen. Des Weiteren können die monothiolierten Polyene für die Synthese von SERS-Dimeren eingesetzt werden. Dabei dient wie im Kapitel 5.9.4 ein C_8 -Linker als Verbrückungsmolekül für zwei super-sphärische AuNP (ssAuNP) und das jeweilige Polyen als ein Raman-Reporter. Jedoch sollten die ssAuNP bei der Verwendung von Polyenen mit sechs und mehr Doppelbindungen über einen C_{16} -Linker verknüpft werden. Auf diese Weise ist die Größe des *hot spots* der optimalen Ausrichtung der Polyenkette angepasst.

In weiterführenden Experimenten kann das Adsorptionsverhalten von **39**, **40** und **41** und **42** in einem XPS-Experiment untersucht werden, da eine Aussage über die genaue Anordnung der Moleküle auf Metalloberflächen notwendig ist. Die Ausbildung von selbstorganisierten Monolagen oder Submonolagen kann mittels Summenfrequenzspektroskopie untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Messungen werden bei der Auswertung der SERS-Spektren behilflich sein.

Ein Teilprojekt dieser Arbeit war die Synthese von dithiolierten Polyenen für die Herstellung von SERS-aktiver Nanopartikel-Dimere. Die Synthese des dithiolierten Acetyl-geschützten Polyens **51** begann mit der Herstellung eines symmetrischen Diesters **43b**. Dann wurde **47** mittels DIBAL-H-Reduktion gefolgt von Mangan(II)-oxid-Oxidation zum Aldehyd **48** umgewandelt. Das bromierte Tetraen **49** wurde infolge einer Wittig-Reaktion synthetisiert und für die Einführung der Thiol-Gruppen verwendet. Dabei lieferte die Kupfer-katalysierte nucleophile Substitution von **49** nicht die Zielverbindung **51**. Ebenso konnte die Synthese ausgehend von **50**, welches durch Umhalogenierung von **49** erhalten werden konnte, nicht realisiert werden. Basierend darauf wurde die Synthese des *tert*-Butyl-geschützten dithiolierten Polyens **54** entwickelt. Dabei wurde zuerst der Baustein **52** synthetisiert. Im nächsten Schritt wurde die Kette um eine weitere Doppelbindung verlängert und gleichzeitig die zweite *t*Bu-Thiolgruppe eingeführt. Dieser Ansatz kann sich künftig für die Synthese von dithiolierten Polyene mit mehr als zwei Doppelbindungen als erfolgreich erweisen, da eine schon zu Beginn eingeführte sterisch anspruchsvolle *tert*-Butyl-Gruppe am Schwefel zur Stabilität der linearen Polyen-Kette beiträgt.

Des Weiteren wurden Synthesen für die Herstellung von **61** und **62** entwickelt. Das nicht-symmetrische Polyen **61** konnte durch Reaktion von **36a** mit **59** nicht synthetisiert werden. Die Umsetzung von **60** mit dem reaktionsfreudigen Phosphorsäureersters **57** führte ebenso nicht zum gewünschten Produkt **61**. Nachdem die Synthese des symmetrischen Polyens **62** aus den Bausteinen **48** und **57** unter den gleichen Reaktionsbedingungen keinen Erfolg ergab, wurde die Reaktionen unter Zusatz einer starken Base *n*-BuLi wiederholt. Jedoch lieferte dieser Ansatz nicht die Zielverbindung **62**.

Über eine Oberflächen-basierte Assemblierungsmethode sollten zwei AuNP zu einem Dimer gekoppelt werden. Dazu wurden 1,8-Octandithiol als Brückenmolekül und der Ethylester des Pentadienethiols **33** als Raman-Reporter verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Dimere herzustellen, die über die Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie charakterisierbar sind. Der Vergleich der gemessenen Ensemble SERS-Spektren der Dimere mit den Raman-Spektren von **33** und deren Simulation bestätigten eine erfolgreiche Immobilisierung von **33** auf der NP-Oberfläche.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Plasmonisch-aktive Gold- und Silbernanopartikel (AuNP & AgNP) mit maßgeschneiderten Raman-Farbstoffen auf Basis von Rhodaminen und Polyenen sind von Interesse und Wichtigkeit für die Bioanalytik mit Hilfe der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (SERS). In dieser Dissertation wurden neue maßgeschneiderte Raman-Farbstoffe synthetisiert, charakterisiert und auf ihre SERS-Aktivität getestet.

Die Raman-Reporter müssen trifunktionell sein und Kriterien, wie großer Raman-Streuquerschnitt, Thiolgruppen für die Chemisorption auf einer Metalloberfläche und Carbonsäure- oder Ester-Gruppen für eine nachfolgende Biokonjugation, erfüllen. Rhodamin 6G wird für viele SERS-Anwendungen wegen des großen Streuquerschnittes und des dazugehörigen starken SERS-Signals eingesetzt. Jedoch lässt sich das Adsorptionsverhalten von diesem kationischen Farbstoff schwer kontrollieren.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das thiolierte Rhodamin 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure (**1**, CRhSH), ausgehend von 5,6-Carboxyrhodamin (**2**, CRh), in einer mehrstufigen Synthese erfolgreich synthetisiert. Die Einführung von Thiolgruppen erfolgte direkt am Chromophor um gute Bedingungen für eine Interaktion von Nanopartikelmetaloberfläche und dem Raman-Reporter **1** zu schaffen. Raman-Bandenzuordnungen für **1** und **2** konnten mit Hilfe von computer-chemischen Rechnungen (DFT) durchgeführt werden. Das Adsorptionsverhalten von **1** und **2** wurde an polydispersen Au-Nanosternen mittels Elektronenmikroskopie (TEM/REM) und SERS untersucht. Die erhaltenen SERS-Spektren von **1** und **2** in kolloidaler Suspension (Ensemble), sowie auf Einzelpartikelniveau, waren reproduzierbar. Weitere SERS-Substrate, wie AuNP auf Siliziumoberflächen (AuNP@Si) und AuNP auf Au-Filmen (AuNP@Au), wurden ebenfalls erfolgreich zur Untersuchung der SERS-Spektren von CRhSH (**1**), CRh (**2**) und Rhodamin 6G verwendet.

Parallel zur Rhodamin-Klasse wurden thiolierte Polyene synthetisiert. Diese Klasse von Raman-Farbstoffen eignet sich aufgrund ihrer zu plasmonischen Metalloberflächen affinen Thiolgruppen und ihres einfachen Raman-Bandenmusters besonders gut für SERS-Anwendungen. Es wurde die vinylischen linearen Polyene Ethyl-(2E,4E)-5-(acetylthio)penta-2,4-dienoat (**29**), Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-(acetylthio)hepta-2,4,6-trienoat (**30**), Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoat (**33**) und Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio))hepta-2,4,6-trienoat (**34**), sowie die phenylischen linearen Polyene Ethyl-(2E,4E)-5-(4-*tert*-butylthio)phenyl-penta-2,4-dienoat (**39**), Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trienoat (**40**), Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoat (**41**) und Ethyl-(2E,4E,6E,8E,10E)-11-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)undeca-2,4,6,8,10-pentaenoat (**42**) mittels Kettenverlängerung in einer DIBAL-H Reduktion in Kombination mit Mangan(II)-oxid-Oxidation & Wittig-Reaktion in situ erfolgreich synthetisiert. Bei der Entwicklung der Synthesen von **29** und **30** konnte gezeigt werden, dass die Einführung von Thiolgruppen besonders im letzten Syntheseschritt erfolgreich durchgeführt werden kann. Außerdem konnte durch die *tert*-Butyl-Schutzgruppe am Schwefel mehr Stabilität der Polyenkette erreicht werden,

wodurch die Polyene **33** und **34** synthetisiert werden konnten. Für längerkettige Polyene musste ein terminaler Phenylring eingeführt werden, um eine Polymerisation zu verhindern.

In konzentrationsabhängigen Raman-Experimenten wurde gezeigt, dass für die Aufnahmen eines Raman-Spektrums von **29** nur ein Fünftel der Konzentration von 4-Mercaptobenzoessäure (4-MBA) benötigt wird. Somit erwiesen sich die vinylischen linearen Polyene mit zwei oder drei Doppelbindungen als bessere Raman-Reporter im Vergleich zu 4-MBA.

Die SERS-Aktivität von **29** und **30** wurde mit Gold-Nanosternen, Gold/Silber-Nanoschalen und super-spärlichen Goldnanopartikeln auf Goldfilmen (AuNP@Au) getestet. Die Adsorption der vinylischen Polyen-Raman-Reporter erfolgte offensichtlich über die Gold-Schwefel-Bindung, da die Raman-Mode bei 821 cm^{-1} (C-S-Schwingung) verstärkt detektiert werden konnte. Die *tert*-Butyl-geschützten Polyene (z.B. **33** und **34**) adsorbierten bereits so auf der Gold-Nanopartikeloberfläche, während **29** und **30** erst nach der Entschützung der Schwefelgruppe adsorbierten. In jedem Fall konnten für alle Polyen-Nanopartikelkompositionen reproduzierbare SERS-Spektren gemessen werden. Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von phenylischen thiolierten Polyenen **39**, **40**, **41** und **42** wurden Au-Nanosterne verwendet. Für das Polyen mit zwei Doppelbindungen **39** wurde fast doppelt so viel Signal wie für Polyen **42** gemessen. Für die Polyene **40**, **41** und **42** wurden vergleichbare SERS-Signale detektiert. Die Signalintensitäten von Raman-Reportern (Rhodamine, Polyene) konnten insgesamt nur schwierig quantitativ verglichen werden, da die Konzentration der Nanopartikel schwankte und verschiedene Geometrien der Nanopartikel (Nanosterne, Nanopartikeldimere oder Oligomere) verschieden starke *hot spot*-Intensitäten erzeugten.

Insgesamt sind die in dieser Arbeit vorgestellten Raman-Reporter für Raman- und SERS-Anwendungen und darüber hinaus vielseitig einsetzbar und daher attraktiv. Die Kettenlänge eines thiolierten Polyens kann beliebig variiert und somit der gewünschten Wellenlänge angepasst werden. Rhodamine können durch Einsatz verschiedener funktioneller Gruppen ebenfalls wellenlängen- und oberflächenchemisch-abhängig angepasst werden. Aufgrund der spektralen Unterschiede sind die *tert*-Butyl-geschützten monothiolierten Polyene **33**, **34**, **39**, **40**, **41** und **42** für Mehrfarben-Multiplexing-Experimente in der SERS-Spektroskopie aufgrund ihrer spektralen Schmalbandigkeit besonders gut geeignet.

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen konnte die Synthese von neuen thiolierten Rhodaminen und längerkettigen mono- und dithiolierten Polyenen deutlich verbessert werden und deren Anwendung als Raman- und SERS-Farbstoffe prototypisch erfolgreich gezeigt werden.

7 Summary and Outlook

Plasmonically active gold and silver nanoparticles (AuNPs and AgNPs) with rationally designed Raman dyes based on rhodamines and polyenes are of interest and importance in Bioanalytics using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). In this dissertation, new Raman dyes were synthesized, characterized and tested for their SERS activity.

The trifunctional Raman dyes (Raman reporters) must fulfill some criteria: large Raman scattering cross section, thiol groups for chemisorption on a metal surface, and carboxylic acid or ester groups for further bioconjugation. Rhodamine 6G is used for many SERS applications because of the large scattering cross-section and the corresponding strong SERS signal. However, the adsorption behavior of this cationic dye is difficult to control.

For this reason the thiolated rhodamine 4-(3,6-diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalic acid (**1**, CRhSH) started from 5,6-carboxyrhodamine (**2**, CRh) was successfully synthesized in a multistep synthesis. The thiol groups were introduced directly at the chromophore to create good conditions for the interaction of nanoparticle metal surface and the Raman reporter **1**. Raman band assignments for **1** and **2** could be performed using computer-chemical calculations (DFT). The adsorption behavior of **1** and **2** was investigated on polydisperse Au nanostars by electron microscopy (TEM/SEM) and SERS. The obtained SERS spectra of **1** and **2** in colloidal suspension (ensemble), as well as on the single particle level, were reproducible. Further SERS substrates, such as AuNP on silicon wafer (AuNP@Si) and AuNP on Au films (AuNP@Au), have also been successfully used to investigate the SERS spectra of CRhSH (**1**), CRh (**2**) and rhodamine 6G.

Parallel to the rhodamines thiolated polyenes were also synthesized. This class of Raman dyes is particularly well suited for SERS applications due to its thiol groups affinity to plasmonic metal surfaces and its simple Raman spectra. The vinylic linear polyenes Ethyl-(2E,4E)-5-(acetylthio)penta-2,4-dienoate (**29**), Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-(acetylthio)hepta-2,4,6-trienoate (**30**), Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoate (**33**) und Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio))hepta-2,4,6-trienoate (**34**), and phenylic linear polyenes Ethyl-2E,4E)-5-(4-*tert*-butylthio)phenyl-penta-2,4-dienoate (**39**), Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trienoate (**40**), Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoate (**41**) und Ethyl-(2E,4E,6E,8E,10E)-11-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)undeca-2,4,6,8,10-pentaenoate (**42**) were successfully synthesized by chain extension in a DIBAL-H reduction in combination with manganese dioxide oxidation & Wittig reaction. In the development of the syntheses of **29** and **30** it was shown that the introduction of thiol groups can be carried out successfully in the last synthesis step. In addition, more stability of the polyene chain could be achieved by the *tert*-butyl protective group at the sulfur, whereby the polyene **33** and **34** could be synthesized. For longer chain polyenes, a terminal phenyl ring had to be introduced to prevent polymerization.

In concentration-dependent Raman experiments, it was shown that only one-fifth of the concentration of 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) is required for recording a Raman spectrum of **29**. Thus the vinylic linear polyenes with two or three double bonds proved to be better Raman reporters

compared to 4-MBA.

The SERS activity of **29** and **30** was tested with gold nanostars, gold/silver nanoshells and super spherical gold nanoparticles on gold films (AuNP@Au). The adsorption of the vinylic Raman reporter was evidently due to the gold-sulfur bond, since the enhanced Raman-mode at 821 cm^{-1} (C-S vibration) could be detected. The *tert*-butyl-protected polyenes (for example **33** and **34**) already adsorbed on the gold nanoparticle surface, whereas **29** and **30** adsorbed only after deprotection of the sulfur. In each case, reproducible SERS spectra could be measured for all polyene nanoparticle composites. To investigate the adsorption behavior of phenylic thiolated polyenes, Au nanostars were used. For the polyene with two double bonds **39** almost two time more signal was measured as for polyene **42**. For the polyenes **40**, **41** and **42** comparable SERS signals were detected. The signal intensities of Raman reporters (rhodamines, polyenes) are difficult quantitatively to compare, since the concentration of the nanoparticles fluctuated and different geometries of the nanoparticles (nanostars, nanoparticle dimers or oligomers) produced different *hot spot* intensities.

Overall, the Raman reporters presented in this work for Raman and SERS applications and also versatile and therefore attractive. The chain length of a thiolated polyene can be arbitrarily varied and thus adapted to the desired wavelength. Rhodamines can also be adapted by using various functional groups as well as depending on their wavelength and surface chemistry. Because of the spectral differences, the *tert*-butyl-protected monothiolated polyenes **33**, **34**, **39**, **40**, **41** and **42** are particularly suitable for multiplexing experiments in SERS spectroscopy because of its spectral narrow bands.

Based on the results obtained in this thesis, the synthesis of novel thiolated rhodamines and long chain mono- and dithiolated polyenes has been significantly improved and their application as Raman and SERS dyes could be demonstrated prototypically.

8 Material und Methoden

8.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Lösungsmittel wurde nach gängigen Literaturvorschriften getrocknet. Dichlormethan wurde zur Vortrocknung über Calciumchlorid gelagert. Dann mit 5-10 g mit P_2O_5 zum Sieden erhitzt und abdestilliert. Diethylether und Tetrahydrofuran wurden ebenso mit Calciumchlorid vorgetrocknet, dann mit Natrium zum Sieden erhitzt und abdestilliert. Die Lösungsmittel für MPLC, wie n-Hexan, Ethylacetat, Methyl-tert-butylether, Dichlormethan wurde mit p.a. Reinheit verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wie $CDCl_3-d_1$ und Methanol- d_4 wurden als käuflich erwerbliche Lösungsmittel benutzt. Reinstwasser für die Sythesen wurde über eine Merck Millipore Anlage des Typs Q-POD σ erhalten. Alle verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle 8.1 zusammengefasst.

Tabelle 8.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-Aminophenol	VWR Chemicals
Ammoniak	Alfa Aesar
1,2,4-Benzoltricarbonsäureanhydrid	VWR Chemicals
4-Bromobenzaldehyd	Alfa Aesar
Chlorsulfonsäure	Sigma Aldrich
Cyclohexan	Fisher Chemicals
Dichlormethan	VWR Chemicals
Diethylether	Fisher Chemicals
Diisobutylaluminiumhydrid	Sigma Aldrich
Dimethylformamid	VWR Chemicals
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
1,4-Dioxan	VWR Chemicals
Essigsäure	VWR Chemicals
Essigsäureethylester	Bernd Kraft
Ethanol	Fisher Chemicals
Ethylbromoacetat	Fluka Analytical
Iod	Sigma Aldrich
Isopropanol	VWR Chemicals
Kaliumcarbonat	Appli Chem
Kaliumhydroxid	Sigma Aldrich
Kieselgel	Sigma Aldrich
Lithiumiodid	Appli Chem
Magnesiumsulfat	VWR Chemicals
Methanol	Fisher Chemicals
Methypropiolat	Alfa Aesar
Methyl-tert-butylether	Fisher Chemicals
Natrium	Riedel-de Haen
Natrium-/Kaliumtartrat	TCI
Natriumborhydrid	Fluka Analytics
Natriumchlorid	Bernd Kraft
Natriumhydrid	Acros Organics
Natriumsulfat	VWR Chemicals
Phosphortribromid	Merck
Schwefelsäure	J.T. Baker
Schwefelsäure rauchend	Merck
tert-Butylmercaptan	TCI
Tetrahydrofuran	Bernd Kraft
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich
Triphenylphosphit	Sigma-Aldrich

8.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Gerät: UV-Lampe (Wellenlängen: 254 nm, 366 nm).

Material: Macherey-Nagel POLYGRAM SIL/UV254.

Die Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von mit Kieselgel beschichteten Platten verfolgt. Die Visualisierung der Flecken erfolgte durch Fluoreszenzquenching mit 254 nm UV-Licht. Die Laufmittel sind in Volumenprozent (v/v) angegeben.

8.3 Präparative Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)

Gerät: Teledyne Isco des Typs Combiflash Rf+.

Material: Redisept Rf-Säule (4 g, 12 g oder 24 g, SiO₂ 40-60 µm).

Die Substanzen wurden auf Kieselgel aufgetragen und in die Vorsäulen gepackt. Die Lösungsmittel-Gradienten sind in Volumenprozent (v/v) den Synthesevorschriften zu entnehmen.

8.4 Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR)

Gerät: Bruker DMX 300 (1H: 300 MHz; 13C: 100 MHz), Bruker DRX 500 (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz).

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und in CDCl₃. Die chemische Verschiebung wurde bezüglich des Lösungsmittelsignals gemessen und in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz angegeben. Folgende Abkürzungen wurden für die Beschreibung der Signale verwendet: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett).

8.5 UV-Vis-Absorptionsspektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Absorptionsspektren der synthetisierten Moleküle und die Extinktionsspektren der verwendeten Edelmetall-Nanopartikel gemessen. Nachdem die Proben mit dem monochromatischen Licht durchstrahlt wurden, wird das transmittierte Licht am Detektor abzüglich der Referenzprobe gemessen. Zuerst wird das Licht mit einem optischen Gitter spektral zerlegt und mit einem Stahlteiler aufgespalten. Dabei wird ein Teil zur Probe und der andere Teil zu der Referenzprobe geleitet. Nach dem Durchstrahlen der beiden Proben wird die restliche Lichtintensität durch die Photodioden gemessen. Somit kann die Extinktion bzw. Absorption im Vergleich zur Referenzprobe bestimmt werden.

Gerät: Jasco, V630 Spektrophotometer.

Material: Quarzglas-Küvette, 2 mm.

Die Messungen erfolgten im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm. Anstelle einer Referenzprobe wurde ein Absorptionsspektrum von Ethanol gemessen, welches von den Proben subtrahiert wurde.

8.6 Raman-Spektroskopie

Bei der Raman-Spektroskopie wird die Probe mit einem Laser einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Dabei wird die Raman-Streuung (inelastische Lichtstreuung) an Molekülen untersucht. In der Abbildung 8.1 ist der schematische Aufbau des verwendeten Raman-Instruments dargestellt. Zuerst wird der Laserstrahl über ein Glasfaserkabel (N) zum Laserkoppler (O) geführt. In diesem ist eine Linse für das Parallelisieren des Lichtes und ein dichroitischer Spiegel für das Ablenken des Lichtes in die Richtung des Objektiv eingebaut. Über das Objektiv wird das Licht auf die Probe fokussiert und das gestreute Licht wieder gesammelt. Das Streulicht transmittiert durch den dichroitischen Spiegel und wird über einen Kantenfilter (P) von den elastisch und unelastisch-gestreuten (nur Anti-Stokes) Anteilen des Lichtes bereinigt und nur die Raman-Streuung wird über einen Lichtleiterkabel (R) zum Spektrometer (U) geführt. Dort wird das Licht im Spektrometer über ein Gitter in die spektralen Anteile aufgelöst und auf einem CCD-Sensor detektiert.

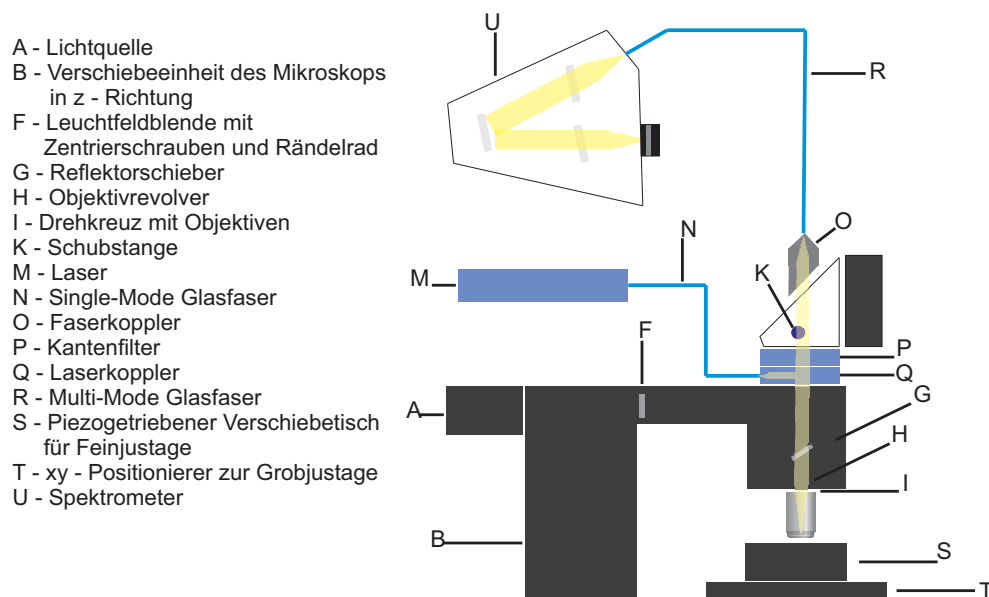


Abbildung 8.1: Schematischer Aufbau eines konfokalen Raman-Mikroskops und die Darstellung des Strahlengangs im Raman-Modus.

Im Hellfeld-Modus wurde das Fokussieren des Lasers durchgeführt. Der Dunkelfeld-Modus wurde zum Auffinden der Nanopartikel eingesetzt. Bei der Dunkelfeldmikroskopie geht das eingestrahlte Licht durch das Objektiv durch. Dann wird dieses Licht im Strahlengang gestreut und vom Objektiv wieder gesammelt.

Im Folgenden wird der Strahlengang für Hell- bzw. Dunkelfeld-Modus beschrieben (Abbildung 8.2). Das von der Lichtquelle (A) stammende Licht passiert den Mikroskopkörper mit Köhler-Beleuchtung (C). Über die Aperturblende (D) und die Leuchtfeldblende (E) kann die Ausleuchtung der Probe reguliert werden. Am Reflektorschieber (G) wird das Licht in Richtung des Objektivs (I) umgeleitet. Nach dem Fokussieren des Lichtes auf die Probe über das Objektiv wird das reflektierte Licht von diesem Objektiv wieder gesammelt. Bei korrekter Stellung der Schubstange (K) wird das Licht über einen Spiegel in Richtung des Binokulars mit eingebauter Kamera (L) umgelenkt, wo ein Abbild der Probe erzeugt wird.

Gerät: Witec Alpha 300 R (Helium-Neon-Laser, Wellenlänge 632.8 nm).

- A - Lichtquelle
- B - Verschiebeeinheit des Mikroskops in z - Richtung
- C - Mikroskopkörper mit Köhler-Beleuchtung
- D, E - Schrauben zum Zentrieren der Aperturblende, Schubstange für die Aperturblende
- G - Reflektorschieber
- H - Objektivrevolver
- I - Drehkreuz mit Objektiven
- K - Schubstange
- L - Binokular mit Kamera

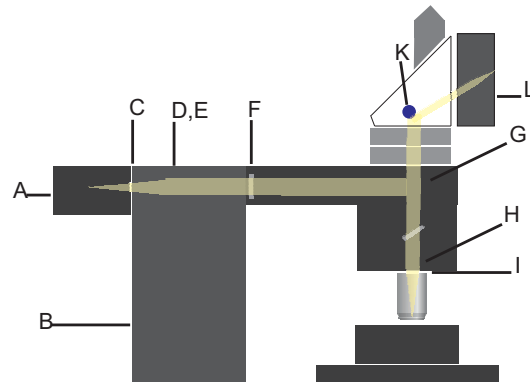


Abbildung 8.2: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Hell-/Dunkelfeld-Modus.

1) SESR-Experimente im Punkt-Belichtungsmodus (point mapping):

AuNP@Si-Substrate: 50xObjektiv (Na 0.75, Olympus), Leistung des Laserlichtes $70 \mu\text{W}$, Integrationszeit: 1 s. Einzelpartikel-SERS mit Gold-Nanosternen: 50xObjektiv (NA 0.75, Olympus), Leistung des Laserlichtes 0.3 mW , Integrationszeit 2 s.

2) SERS-Experimente mit Au-Nanosternen- und AgNP-Kolloiden (Punktmessungen):

40xObjektiv (NA 0.6, Olympus), Leistung des Laserlichtes 10 mW , Integrationszeit 10 s.

3) SERS-Experimente mit AuNP@Au-Substraten (Punktmessung):

10xObjektiv (NA 0.25, Olympus), Leistung des Laserlichtes 0.3 mW , Integrationszeit 2 s.

Gerät: Bruker Senterra (Argon-Ionenlaser, 488 nm).

1) Raman-Spektren der Polyene:

20xObjektiv (NA 0.4, Olympus), Leistung des Laserlichtes 10 mW , Integrationszeit 60 s.

2) SERS-Experimente mit AuNP@Si-Substraten:

20xObjektiv (NA 0.4, Olympus), Leistung des Laserlichtes 20 mW , Integrationszeit 60 s.

3) SERS-Experimente mit Au-Nanosterne Kolloid und Polyenen bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm .

20xObjektiv (NA 0.4, Olympus), Leistung des Laserlichtes 10 mW , Integrationszeit 60 s.

8.7 Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Beim Rasterelektronenmikroskop (REM) wird ein gebündelter Elektronenstrahl, der beispielsweise durch eine Feldemissionskathode erzeugt wird, auf die zu untersuchende Probe gestrahlt. Beim Auftreffen auf die Oberfläche kommt es beispielsweise zum Herausschlagen von Sekundärelektronen aus den obersten Schichten der Materie. Diese Sekundärelektronen werden vom Detektor abgesaugt und die Menge der herausgeschlagenen Elektronen gibt dabei die Information über die Topographie der Probe an. Durch Abrastern der Oberfläche kann das Material mit einer sehr hohen laterale Auflösung untersucht werden.

Gerät: JEOL, VJSM-7500F.

8.8 Dichtefunktionaltheorie

Alle DFT-Rechnungen wurden mit dem Programm Gaussian 03 durchgeführt.^[145] Die Gleichgewichtsstrukturen wurden durch Sicherstellen, dass keine negativen Frequenzen beobachtet wurden, erhalten.

Software: GaussView 5.0.

Methode (Absorptionsspektren in Lösung): CAM-B3LYP-6311g++ (d,p).

Methode (Absorptionsspektren in Lösung): TD-SCF.

Solvatisierungsmodell: CPCM (Solvent: Ethanol).

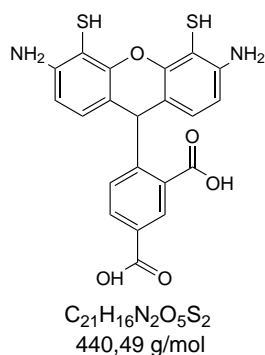
Methode (Raman): B3LYP-6311g++ (d,p).

Skalierungsfaktor: 0.97.

Die computerunterstützte Rechnungen wurden für die Ermittlung der Raman- und Absorptionsspektren verwendet.

8.9 Synthesevorschriften

8.9.1 4-(3,6-diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure (1)

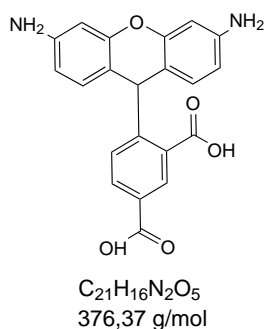


In einem Einhalskolben mit einem Rückflusskühler wurden 50 mg (90 μmol) von **7** in 10 ml DMF gelöst und mit 141 mg (0.5 mmol, 6 Äq) Triphenylphosphin und einer katalytischen Menge Iod gemischt. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt und die erhaltene Substanz säulenchromatographisch mit einem Laufmittel DCM:MeOH 10:1 mit 1 %-igen Essigsäure gereinigt. Das Produkt konnte mit 38 % (15 mg, 3.4 μmol) Ausbeute als ein Isomerengemisch isoliert werden.

^1H -NMR (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 1:1): δ = 8.4 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.1 (d, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.2 (m, 3H), 7.05-7.11 (q, 1H), 6.8 (m, 1H), 6.6-6.7 (m, 3H) ppm.

ESI: m/z 441.3 g/mol ($\text{M}+\text{H}^+$).

8.9.2 4-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (2)



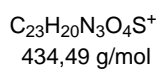
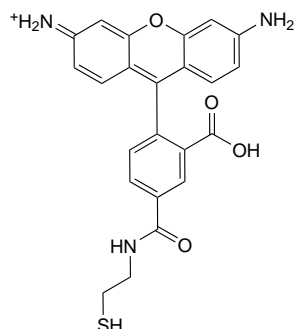
In einem Dreihalskolben mit einem Rückflusskühler, Blasezähler und Einweghahn für N_2 -Einleitung wurden 4 ml konzentrierter Schwefelsäure vorgelegt. Unter starkem Rühren wurden 0.93 g (9 mmol) 3-Aminophenol (**9**) und 0.82 g (4 mmol) 1,2,4-Benzotricarbonsäureanhydrid (**10**) dazugegeben. Unter Gaseinleitung wurde das Reaktionsgemisch auf 180°C erhitzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 30 ml eiskaltem Wasser versetzt. Der ausgefallene dunkelrote Feststoff wurde abgesaugt und in Ammoniak-Lösung (1:4) aufgenommen. Nun wurde mit konzentrierter Salzsäure pH 2 eingestellt und der Feststoff erneut über einen Büchnertrichter abgesaugt. Die Reinigung mittels MPLC über eine RP C18-Säule mit 30 % MeOH lieferte das Produkt in 66 % (1 g, 2.6 mmol) Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 8.89 (dd, 1H), 8.4 (m, 3H), 8.0 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 7.2 (m, 3H), 6.8-7.2 (m, 7H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 168.1 (CO), 157 (C_q), 156.2 (CH), 154.8 (CH), 150 (CH), 138 (C_q), 130 (C_q), 122.5 (C_q), 119.8 (CH), 118.9 (CH), 101.5 (CH), 103.4 (CH) ppm, 45.1 (CH).

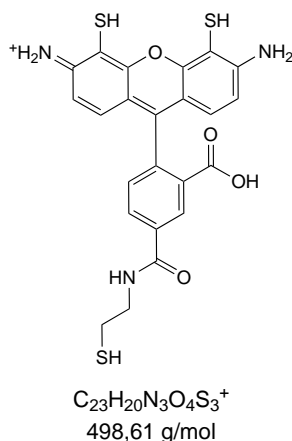
ESI: m/z 376.13 g/mol ($\text{M}+\text{H}^+$).

8.9.3 2-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)-5-[(2-sulfanylethyl)carbamoyl]benzoesäure (3)



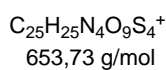
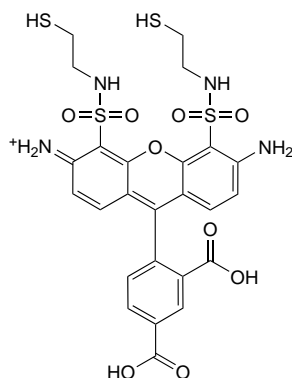
In einem Einhalskolben ausgestattet mit einem Blasenähler wurden 120 mg (0.3 mmol) von **2** in DMSO gelöst und unter Eiskühlung mit 82 mg (0.4 mmol) DCC und 6.1 mg (0.05 mmol) DMAP versetzt. Nach 20 min Reaktionszeit wurden 15.4 mg (0.2 mmol) Cysteamin zugegeben und der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der zurückgebliebene Feststoff in Aceton aufgenommen. Der nicht gelöste Feststoff wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung des Farbstoffes erfolgte mittels einer Kieselgelsäule in DCM/ MeOH (2:1).

8.9.4 6-Amino-9(2-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)carbamoyl)phenyl)-4,5-dimercapto-3H-xanthen-3-iminium (4)



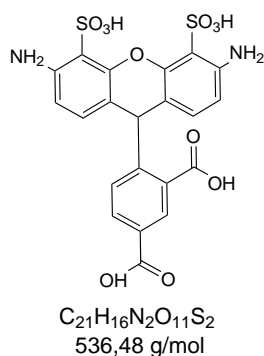
In einem Einhalskolben ausgestattet mit einem Blasenähler wurden 167 mg (0.37 mmol) **1** in DM-SO gelöst und unter Eiskühlung mit 82 mg (0.4 mmol) DCC und 7 mg (0.05 mmol) DMAP versetzt. Nach 20 min Reaktionszeit wurden 15.4 mg (0.2 mmol) Cysteamin zugegeben und der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der zurückgebliebene Feststoff in Aceton aufgenommen. Der nicht gelöste Feststoff wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Die Reinigung des Farbstoffes wurde mittels einer Kieselgelsäule in DCM/ MeOH (2:1) erprobt.

8.9.5 4-(3,6-Diamino-4,5-bis[(2-sulfanylethyl)sulfamoyl]-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (5)



In einem Einhalskolben ausgestattet mit einem Rückflusskühler wurden 0.4 g (0.75 mmol) **6** in 2 ml DMF abs. vorgelegt. Unter Eiskühlung wurden 74 mg (0.25 mmol) BTC zugegeben. Nach 5 min Reaktionszeit wurde das Gemisch auf 80 °C für 2 Stunden erhitzt. Dann wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0.1 g (1.5 mmol) Cysteamin in 2 ml Pyridin/THF Mischung (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Kolbenrückstand in 2 M HCl aufgenommen. Nach der Extraktion mit Ethylacetat wurde die organische Phase mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

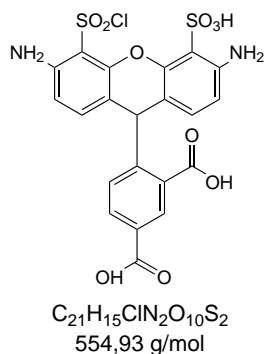
8.9.6 4-(3,6-Diamino-4,5-disulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (6)



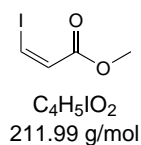
Eine Mischung aus 8 ml konzentrierter und 12 ml rauchender Schwefelsäure wurde auf 0 °C abgekühlt und 3 g 5,6-Carboxyrhodamin (2) wurden portionsweise zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurden 67 ml 1,4-Dioxan auf Eis zum Erstarren gebracht und unter Rühren wurde der Reaktionsansatz auf 1,4-Dioxan gegossen. Der Kolben wurde mit weiteren 30 ml 1,4-Dioxan nachgespült. Das Gemisch wurde mit 70 ml Diethylether versetzt und unter kräftigem Rühren und Eiskühlung das Produkt gefällt. Nach dem Absaugen wurde der Feststoff in 50 ml Isopropanol aufgenommen und unter Rückfluss kurz gekocht. Nach dem Abkühlen wurden zum Ansatz 30 ml Diethylether zugegeben und über Nacht gefällt. Anschließend wurde der ausgefallene Feststoff abgesaugt und mit weiteren 30 ml Ether gewaschen. Der dunkelrote grünfluoreszierende Farbstoff wurde am Vakuum getrocknet. Zur Reinigung wurde eine Kieselgelsäule mit Acetonitril/Wasser (12:1) und eine RP C18 Säule mit 0.1 % TFA in Acetonitril vorbereitet.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ = 8.32 (s, 1H), 8.03 (d, 1H), 8.0 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 6.23 (d, 2H), 6.17 (d, 2H) ppm.

8.9.7 4-(3,6-Diamino-4-sulfonylchloride-5-sulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (7)



In einem Zweihalskolben mit einem Rückflusskühler und einem Einweghahn für die Argon-Einleitung wurden 102 mg (0.28 mmol) 5,6-Carboxyrhodamin (**2**) vorgelegt und bei 0 °C mit 2 ml Chlorsulfonsäure versetzt. Dann wurde der Ansatz auf 80 °C für 1 Stunde erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit 2 ml rauchender Schwefelsäure gemischt und für weitere 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter starkem Rühren auf Eis gegossen und der ausgefallene Feststoff wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt. Diese Verbindung wurde ohne weitere Reinigung für die nächsten Syntheseschritte verwendet.

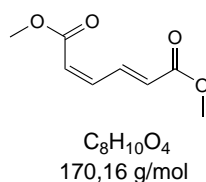
8.9.8 3-Iodo-2Z-propensäuremethylester (**12a**)

Eine Suspension von LiI·H₂O (6.69 g, 0.05 mol) in 30 ml getrocknetem Acetonitril wurde mit Essigsäure (3 g, 0.05 mol) und Methylpropiolat (**11**) (4.2 ml, 0.047 mol) versetzt. Die Mischung wurde für 24 Stunden refluxiert und ohne Aufarbeitung für weitere Reaktionen verwendet.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.79 (s, 3H, OCH₃), 6.91 (d, 1H, CH), 7.47 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 165 (CO), 129.5 (CH), 99.7 (CH), 51.6 (CH₃) ppm.

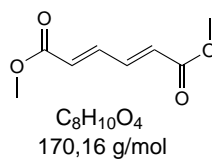
DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃): δ = 129.53 (CH), 95.22 (CH), 51.63 (CH₃) ppm.

8.9.9 1,6-Dimethyl-2Z,4E-hexadiester (**43a**)

Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung von **12a** auf Raumtemperatur wurden Methylacrylat (16.2 g, 0.188 mol), Silbercarbonat (19 g, 0.07 mol) und Palladiumacetat (0.53 g, 2.35 mmol) zu Reaktion zugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Petrolether 100 %) wurde das Produkt mit 71 % Ausbeute erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.314 (q, 6H, (CH₃)₂), 5.90-6.13 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (t, 1H, CH), 7.14-7.17 (t, 1H, CH), 7.38-7.44 (d, 1H, CH) ppm.

8.9.10 (2E,4E)-Dimethyl-hexa-2,4-dienoat (43b)



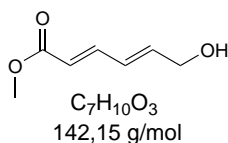
Eine Lösung von Methyl (2Z,4E)-6-oxohexa-2,4-dienoat (**43a**) (0.6 g, 3.34 mmol) in Acetonitril (10 ml) wurde mit (30 mg, 3.3 mol%) Iod versetzt und für 24 Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit einer Mischung aus Diethylether/Hexan (3:2) coevaporiert. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff mit 97 % (0.58 g) Ausbeute isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.314 (q, 6H, (CH₃)₂), 5.90-6.13 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (t, 1H, CH), 7.14-7.17 (t, 1H, CH), 7.38-7.44 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 168 (CO), 142 (CH), 129 (CH), 99 (CH), 52 (CH₃) ppm.

DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃): δ = 142 (CH), 129 (CH), 52 (CH₃) ppm.

8.9.11 Methyl(2E,4Z)-6-hydroxyhexa-2,4-dienoat (44)



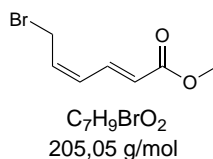
Eine Suspension aus (2E,4E)-Diemthyl-hexa-2,4-dienoat **43b** (15 mg, 0.09 mmol) und CaCl_2 (627 mg) in 10 ml EtOH/THF 1:1 wurde mit Natriumborhydrid (133 mg) portionsweise bei 0 °C versetzt. Nach 24 Stunden Rühren wurde die Reaktion mit Wasser gequencht und mit DCM (3x10 ml) extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurden über Na_2SO_4 getrockent und das Lösungsmittel am Rota- tionsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde mit 31 % (0.004 g, 0.03 mmol) Ausbeute isoliert.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.36 (q, 3H, CH_3), 3.76 (m, 1H, OH), 4.22 (m, 2H, CH_2), 5.8 (m, 1H, CH), 6.12 (m, 1H, CH) 6.31 (m, 1H, CH), 6.52 (m, 1H, CH) ppm.

^{13}C -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 175 (CO), 145 (CH), 142.5 (CH), 125 (CH), 117 (CH), 62.5 (CH_2), 52 (CH_3) ppm.

DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3): δ = 145 (CH), 142.5 (CH), 125 (CH), 117 (CH), 62.5 (CH_2), 52 (CH_3) ppm.

8.9.12 Methyl(2E,4Z)-6-bromohexa-2,4-dienoat (45)



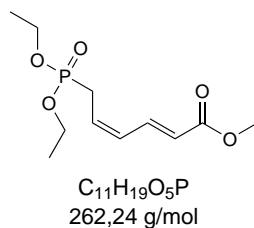
Methyl(2E,4Z)-6-hydroxyhexa-2,4-dienoat (**44**) (190 mg, 1.34 mmol) und Pyridin (10 μ L, 0.1 Äq) wurden in DMF (10 ml) aufgenommen und mit Phosphortribromid (568 mg, 2.01 mmol, 1.5 Äq.) portionsweise und bei 0 °C versetzt. Nach 10 min wurde die Mischung auf Raumtemperatur gebracht und für weitere 2 Stunden gerührt. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung bei 0 °C mit Wasser gequencht und mit Ethylacetat (3x10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit 53 % (0.15 g, 0.7 mmol) Ausbeute isoliert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.314 (q, 3H, CH₃), 4.22 (m, 2H, BrCH₂), 5.90-6.13 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (t, 1H, CH), 7.14-7.17 (t, 1H, CH), 7.38-7.44 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 175 (CO), 145 (CH), 142.5 (CH), 125 (CH), 117 (CH), 32.8 (CH₂), 52 (CH₃) ppm.

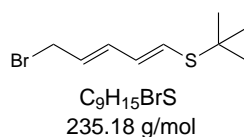
DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃): δ = 145 (CH), 142.5 (CH), 125 (CH), 117 (CH), 32.8 (CH₂), 52 (CH₃) ppm.

8.9.13 Methyl(2E,4Z)-6-(diethoxyphosphoryl)-hexa-2,4-dienoat (46)

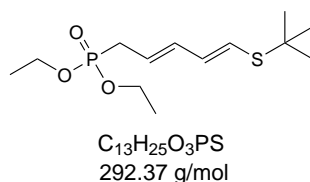


Eine Lösung von Methyl(2E,4Z)-6-bromohexa-2,4-dienoat (**45**) (0.15 g, 0.7 mmol) in Toluol (15 ml) wurde mit Triethylphosphit (0.188 mg, 1.1 mmol, 1.5 Äq) versetzt und für 12 Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur wurde Ethylacetat zugegeben und die Mischung mit Wasser (3x5 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (1x5 ml) extrahiert. Das Produkt wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung (Kieselgelsäule 12 g, MPLC, Cyclohexan/Ethylacetat, Gradient 90 % Ethylacetat nach 14 min) mit 19 % (0.035 g, 0.13 mmol) Ausbeute isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.22-1.41 (m, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.65-2.76 (dd, 2H, CH_2), 4.07-4.2 (q, 4H, PCH_2), 5.9 (d, 1H, CH), 6.1 (m, 1H, CH), 6.3 (m, 1H, CH) 7.2 (q, 1H, CH) ppm.

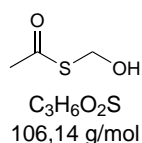
8.9.14 ((1E,3E)-5-Brompenta-1,3-dien-1-yl)(*tert*-butyl)sulfan (**58**)

(2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dien-1-ol (**58**) (0.15 g, 0.87 mmol, 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst und unter starkem Rühren bei 0 °C mit Pyridin (0.01 g, 0.1 mmol, 0.12 Äq) und Phosphortribromid (0.05 g, 1.3 mmol, 1.5 Äq) versetzt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser (20 mL) gequencht. Die organische Phase wurde getrennt und die wässrige Phase mit Ether (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (20 mL), einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 mL) und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit 74 % (0.15 g, 0.644 mmol) Ausbeute synthetisiert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt umgesetzt.

8.9.15 Diethyl-((2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dien-1-yl)-phosphonat (**59**)

((1E,3E)-5-Brompenta-1,3-dien-1-yl)(*tert*-butyl)sulfan (**59**) (0.15 g, 0.644 mmol, 1.0 Äq) und Triethylphosphit (0.15 g, 0.16 mL, 0.96 mmol, 1.1 Äq) wurden in Toluol (25 mL) für 12 Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz mit Ethylacetat (20 mL) versetzt und mit Wasser (3x20 mL) und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (1x25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (MPLC, SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1, 5:1) gereinigt und das Produkt mit 5 % (8.4 mg, 0.03 mmol) Ausbeute isoliert.

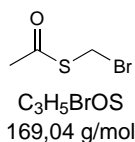
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.23-1.36 (s, 13H, (CH₃)₅), 3.2 (dd, 2H, CH₂), 4.24 (q, 4H, (CH₂)₂), 5.67 (t, 1H, CH), 5.8 (d, 1H, CH), 6.18 (dd, 1H, CH), 6.5 (dd, 1H, CH) ppm.

8.9.16 S-(Hydroxymethyl)ethanthioat (20)

Thioacetat (2 g, 1.9 ml) und Formaldehyd (0.8 g) wurden vorgelegt und für 3 Stunden bei 90 °C refluxiert. Anschließend wurde der Ansatz über einen Faltenfilter filtriert und ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

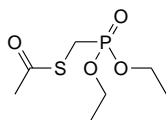
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.38 (s, 3H, CH₃), 4.2 (s, 1H, OH), 5 (s, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 194.5 (CO), 81.4 (CH₂), 30.6 (CH₃) ppm.

8.9.17 S-(Bromomethyl)ethanthioat (21)

S-(hydroxymethyl)ethanthioat (**20**) (2 g) wurde unter Eiskühlung und Argonfluß mit Phosphotribromid (1.9 g, 0.6 ml) tropfenweise versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min gerührt und dann auf Eis-Wasser-Gemisch gekippt. Die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert (3x10 ml). Die organische Phase wurde mit Wasser (2x10 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.38 (s, 3H, CH₃), 4.68 (s, 2H, CH₂) ppm.

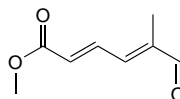
8.9.18 S-((diethoxyphosphoryl)methyl)ethanthioat (**22**)

$C_7H_{15}O_4PS$
226,23 g/mol

Eine Mischung aus Triethylphosphit (4.85 g, 29.3 mmol) und S-(bromomethyl)ethanthioat (**21**) (1 g, 6 mmol) wurde für 3 Stunden bei 130 °C erhitzt. Dabei wurde Bromethan über einen Wasserabscheider gesammelt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit Ethylacetat extrahiert (3x15 ml). Das Produkt konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung mit Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 mit 80 % (1.1 g, 5 mmol) Ausbeute erhalten werden.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.27 (s, 6H, $(CH_3)_2$), 2.36 (s, 3H, CH_3), 3.18 (d, 2H, CH_2), 4.2 (m, 4H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 194, 54, 30.6, 27.6 (CH_3) ppm.

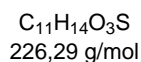
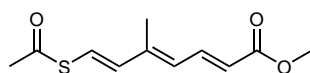
8.9.19 Methyl-(2E,4E)-5-methyl-6-oxohexa-2,4-dienoat (**16**)

$C_8H_{10}O_3$
154,17 g/mol

3-Iodo-2Z-propensäuremethylester (**12a**) (1.7 g, 8 mmol) wurden mit Metacrolein (**15**) (2 ml, 24 mmol), Silbercarbonat (1.1 g, 4 mmol) und Palladumacetat (0.22 g, 0.1 mmol) versetzt und der Ansatz wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung über einen Faltenfilter filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule filtriert (Petrolether/Ethylacetat, 15:1). Das Produkt wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1) mit 39 % (0.5 g) Ausbeute als ein Gemisch mit Metacrolein (**15**) isoliert.

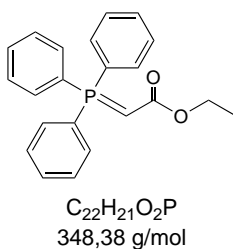
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.8 (s, 3H, (CH_3)), 3.81 (s, 3H, CH_3), 6.41 (d, 1H, CH), 7.36 (d, 1H, CH), 7.7 (dd, 1H, CH), 9.7 (s, 1H, CHO) ppm.

ESI: m/z 177 g/mol ($M+Na^+$).

8.9.20 Methy-(2E,4E,6E)-7-(acetylthio)-5-methylhepta-2,4,6-trienoat (**24**)

S-((diethoxyphosphoryl)methyl)ethanthioat (**22**) (0.88 g, 3.89 mmol) wurden in 4 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Natriumhydrid-Lösung (93 mg, 3.88 mmol in THF) wurde zum Reaktionsansatz langsam zugetropft und die Mischung so lange nachgerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Eine Suspension von Methyl-(2E,4E)-5-methyl-6-oxohexa-2,4-dienoat (**16**) (0.5 g, 3.25 mmol) in 2 ml Tetrahydrofuran wurde zum Ansatz bei 0 °C zugegeben. Nach 3 Stunden wurde die Reaktion mit Wasser gequencht und mit Diethylether (3x10 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert.

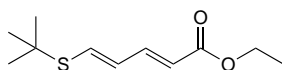
8.9.21 (Ethoxy-carbonylmethylene)-triphenylphosphoran (26)



Eine Mischung aus Triphenylphosphin (5.24 g, 0.015 mol) und Ethyl-2-bromoacetat (3.4 g) in 40 ml Ethylacetat wurden für 20 Stunden refluxiert. Dann wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und der ausgefallene farblose Feststoff über einen Büchnertrichter abfiltriert. Anschließend wurde das Filtrat in 50 ml DCM gelöst und mit KOH (1.7 g, 50 ml H₂O) extrahiert. Die organischen Phasen wurden gesammelt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff mit 87 % (6.09 g, 17.42 mmol) Ausbeute isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.15 (s, 3H, CH₃), 2.87 (s, 1H, CH) 3.97 (s, 2H, CH₂), 7.41-7.71 (m, 15H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 169 (CO), 132 (CH), 130 (CH), 128.7 (CH), 127.1 (CH), 58 (CH₂), 31 (PCH), 15 (CH₃) ppm.

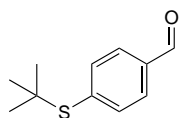
8.9.22 Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoat (33)

C₁₁H₁₈O₂S
214,32 g/mol

Zunächst wurde Natrium (0.07 g, 2.81 mmol) gelöst in Ethanol (10 mL) vorgelegt. Unter Argonfluß wurde *tert*-Butylmercaptan (0.25 g, 0.32 mL, 2.81 mmol) bei 0 °C zum Gemisch zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde zu der Mischung Ethyl-(2E,4E)-5-iodpenta-2,4-dienoat (**27b**) zugegeben und für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit Wasser (20 mL) gequencht, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase mit DCM (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Ethylacetat/Cyclohexan 1:10) gereinigt und das Produkt mit 99 % (0.6 g, 2.8 mmol) Ausbeute als gelbliches Öl isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.314 (q, 12H, (CH₃)₄), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.90-6.13 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (t, 1H, CH), 7.14-7.17 (t, 1H, CH), 7.38-7.44 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 166.9 (CO), 138.3 (CH), 130.2 (CH), 121 (CH), 60 (CH₃), 47 (C_q), 30 (CH₂), 15 ((CH₃) ppm.

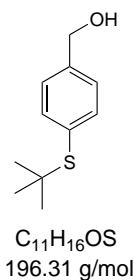
8.9.23 4-(*tert*-Butylthio)benzaldehyd (**36a**)

C₁₁H₁₄OS
194,29 g/mol

Zu einer Suspension aus Kaliumcarbonat (5.95 g, 46.4 mmol) in absolutem DMF (30 mL) wurde unter Argonfluß *tert*-Butylmercaptan (1.17 g, 1.47 mL, 13.0 mmol) und 4-Brombenzaldehyd (**34**) (1.72 g, 9.28 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde für 72 Stunden bei 150 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Wasser (50 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase mit Ethylacetat (4x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit 83 % (1.51 g, 7.75 mmol) Ausbeute isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.34 (s, 9H, (CH₃)₃), 7.82 (m, 2H, CH), 7.68 (m, 2H, CH), 10.03 (s, 1H, CHO) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 191.5 (CHO), 133 (CH), 129.5 (CH), 128 (CH), 127.9 (CH), 45 (C_q), 31 (CH₃) ppm.

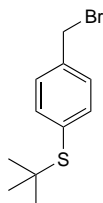
8.9.24 4-(*tert*-Butylthio)benzalkohol (55)

Eine Lösung von 4-(*tert*-Butylthio)benzaldehyd **36a** (0.58 g, 2.97 mmol, 1.0 Äq) in Methanol (30 mL) wurde bei 0 °C unter Rühren langsam mit Natriumtetrahydroborat (0.34 g, 8.92 mmol, 3 Äq) versetzt. Nach 4 Stunden Rühren bei 0 °C wurde der Ansatz auf Eiswasser (30 mL) gegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit 87 % (0.51 g, 2.6 mmol) Ausbeute synthetisiert.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.28 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.72 (s, 2H, CH₂), 7.33 (d, 2H, CH), 7.52 (d, 2H, CH) ppm.

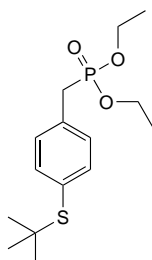
¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 137.8 (CH), 129.3 (CH), 128 (CH), 127.5 (CH), 45 (CH₂), 31 (CH₃) ppm.

8.9.25 (4-(Brommethyl)phenyl)-(tert-butyl)sulfan (56)



$C_{11}H_{15}BrS$
259.21 g/mol

4-(tert-Butylthio)benzalkohol (**55**) (0.42 g, 2.15 mmol, 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (30 mL) gelöst und bei 0 °C portionsweise mit Phosphortribromid (0.58 g, 2.15 mmol, 1.0 Äq) gemischt. Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz langsam auf Eiswasser (30 mL) gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3x25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in 95 % (0.53 g, 2.04 mmol) Ausbeute erhalten.

8.9.26 Diethyl-(4-(*tert*-butylthio)benzyl)phosphonat (57)

C₁₅H₂₅O₃PS
316.40 g/mol

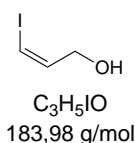
(4-(Bromomethyl)phenyl)-(*tert*-butyl)sulfan (**56**) (0.59 g, 2.27 mmol, 1.0 Äq) und Triethylphosphit (0.94 g, 0.97 mL, 5.67 mmol, 2.5 Äq) wurden in Toluol (25 ml) für 12 Stunden bei 145 °C gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (20 mL) versetzt, mit Wasser (3x20 mL) und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (1x25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (MPLC, SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, Gradient bis 100 % Ethylacetat) und das Produkt mit 53 % (0.38 g, 1.21 mmol) Ausbeute erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.24 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.35 (m, 6H, (CH₃)₂), 4.00 (dd, 2H, CH₂), 4.13 (m, 4H, OCH₂), 7.15-7.57 (m, 4H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 131.8 (CH), 129.4 (CH), 127.9 8CH), 62 (CH), 45 (CH₂), 33.5 (CH₂), 31 (CH₃), 15 (CH₃) ppm.

8.9.27 Allgemeine Vorschrift für DIBAL-H-Reduktion

Ein Äquivalent des jeweiligen Esters wurde in DCM gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Dann wurde der Ansatz unter Argonfluß bei 0 °C mit 6 Äq DIBAL-H (1 M Lösung in DMC) tropfenweise versetzt. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung unter Kühlung mit einem Eisbad mit Methanol versetzt und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit Na/K-Tartrat-Lösung versetzt und weitere 40 min kräftig gerührt. Des Weiteren wurde die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

8.9.28 (Z)-3-Iodoprop-2-en-1-ol (25a)

Synthese

12a (1.68 g, 7.9 mmol)

DIBAL-H (16.6 ml, 16.6 mmol, 2.1 Äq)

Lösungsmittel DCM

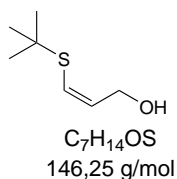
Aubeute 98 % (2.78 g, 15.13 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.63 (s, 1H, OH), 4.25 (d, 2H, CH_2), 6.37 (d, 1H, CH), 6.45 (q, 1H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 140.06 (CH), 82.7 (CH), 65.7 (CH_2) ppm.

DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3): δ = 140.06 (CH), 82.7 (CH), 65.7 (CH_2) ppm.

8.9.29 (E)-3-(*tert*-Butylthio)prop-2-en-1-ol (**32a**)



Synthese

Methyl-(Z)-3-(*tert*-butylthio)acrylat (**31**) (0.3 g, 1.7 mmol)

DIBAL-H (0.6 ml, 0.6 mmol, 2.5 Äq)

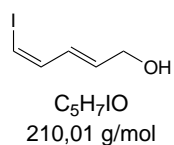
Lösungsmittel DCM

Aubeute 36 % (0.11 g, 0.75 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.3 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 4.1 (d, 2H, CH_2), 5.9 (m, 1H, CH), 6.4 (d, 1H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 138.4 (CH), 119.1 (CH), 58 (CH_2), 47.2 (C_q), 30.5 (CH_3) ppm.

8.9.30 (2E,4Z)-5-iodopenta-2,4-dien-1-ol (**25b**)



Synthese

Ethyl-(2E,4E)-5-iodopenta-2,4-dienoat (**27a**) 0.5 g, 2.4 mmol

DIBAL-H (8 ml, 8 mmol, 2.1 Äq)

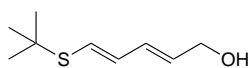
Lösungsmittel DCM

Aubeute 72 % (0.3 g, 1.4 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.15 (dd, 2H, CH_2), 5.83 (m, 1H, CH), 6.16 (m, 1H, CH), 6.75 (q, 1H, CH), 7.05 (q, 1H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 134.5 (CH), 130.4 (CH), 130.9 (CH), 94.2 (CH), 62.7 (CH_2) ppm.

8.9.31 (2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dien-1-ol (32b)



C₉H₁₆OS
172,29

Synthese

33 (0.14 g, 0.62 mmol, 1.0 Äq)

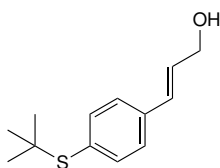
DIBAL-H (0.35 g, 2.5 mL, 2.41 mmol, 3.7 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 66 % (0.33 g, 2.91 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (m, 9H, (CH₃)₃), 3.76 (m, 1H, OH), 4.21 (m, 2H, CH₂), 5.80 (m, 1H, CH), 6.12 (m, 1H, CH), 6.31 (m, 1H, CH), 6.52 (m, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 131.5 (CH), 130.3 (CH), 124.3 (CH), 63.7 (CH₂), 44.4 (C_q), 31.8 (CH₃) ppm.

8.9.32 (E)-3-(4-(*tert*-Butylthio)phenyl)hepta-2,4-dien-1-ol (38a)

C₁₃H₁₈OS
222,35 g/mol

Synthese

Ethyl-(E)-3-(4-(*tert*-butylthiol)pentyl)acrylat (**37**) (0.4 g, 1.4 mmol, 1.0 Äq)

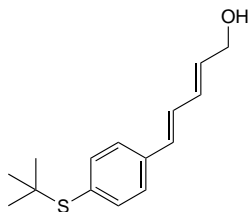
DIBAL-H (7 mL, 4.7 mmol, 14 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 72 % (0.23 g, 1 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.23 (d, 2H, CH₂), 5.92 (m, 1H, CH), 6.8-6.9(d, 1H, CH), 7.38 (d, 2H, CH), 7.45 (d, 2H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 130.4 (CH), 129 (CH), 128.0 (CH), 127.4 (CH), 62.7 (CH₂), 46 (C_q), 31.2 (CH₃)ppm.

8.9.33 (2E,4E)-5-(4-(*tert*-Butylthio)phenyl)penta-2,4-dien-1-ol (38b)

C₁₅H₂₀OS
248,38 g/mol

Synthese

Ethyl-(2E,4E)-5-(4(*tert*-butylthio)phenyl-hepta-2,4-dienoat (**39**) (0.1 g, 0.3 mmol, 1.0 Äq)

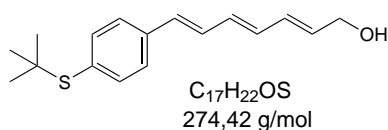
DIBAL-H (1 mL, 0.68 mmol, 2 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 88 % (0.08 g, 0.3 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.23 (d, 2H, CH₂), 5.92 (m, 1H, CH), 6.5 (q, 2H, CH), 6.8-6.9(d, 1H, CH), 7.38 (d, 2H, CH), 7.45 (d, 2H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 139 (CH), 135.5 (CH), 130.4 (CH), 127.0 (CH), 126.1 (CH), 124.4 (CH), 62.7 (CH₂), 46 (C_q), 31.2 (CH₃)ppm.

8.9.34 (2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-Butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-ol (38c)**Synthese**

Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4(*tert*-butylthio)phenyl-hepta-2,4,6-trienoat (**40**) (0.09 g, 0.28 mmol, 1.0 Äq)

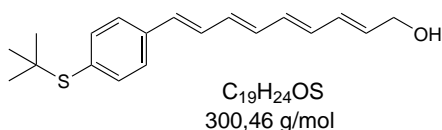
DIBAL-H (1 mL, 1 mmol, 3.7 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 81 % (0.06 g, 0.23 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.23 (d, 2H, CH₂), 5.92 (m, 1H, CH), 6.39 (m, 3H, CH), 6.55-6.59(d, 1H, CH), 6.84 (m, 1H, CH), 7.38 (d, 2H, CH), 7.45 (d, 2H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 139 (CH), 135.5 (CH), 130.4 (CH), 129.1 (CH), 128.6 (CH), 127.0 (CH), 126.1 (CH), 124.4 (CH), 62.7 (CH₂), 46 (C_q), 31.2 (CH₃)ppm.

8.9.35 (2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-Butylthiol)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol (38d)**Synthese**

Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-Butylthio)phenyl)hepta-2,4,6,8-tetraenoat (**41**) (0.04g, 0.11 mmol, 1.0 Äq)

DIBAL-H (0.3 mL, 0.3 mmol, 3.7 Äq)

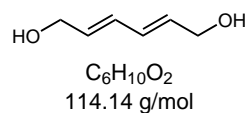
Lösungsmittel DCM

Aubeute 57 % (0.02 g, 0.06 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃), 4.21 (d, 2H, CH₂), 5.88 (m, 1H, CH), 6.3-6.42 (m, 3H, CH), 6.57(d, 2H, CH), 6.84 (m, 1H, CH), 7.38 (d, 2H, CH), 7.45 (d, 2H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 139 (CH), 135.5 (CH), 132.2 (CH), 130.4 (CH), 129.1 (CH), 128.6 (CH), 127.9 (CH), 126.5 (CH), 62.7 (CH₂), 46 (C_q), 31.2 (CH₃) ppm.

8.9.36 (2E,4E)-Hexa-2,4-dien-1,6-diol (47)



Synthese

43b (0.75 g, 4.41 mmol, 1.0 Äq)

DIBAL-H (4.3 g, 30 mL, 30 mmol, 6.8 Äq)

Lösungsmittel DCM

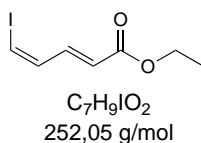
Aubeute 66 % (0.33 g, 2.91 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.55 (m, 1H, OH), 4.20 (d, 4H, CH_2), 5.86 (m, 2H, CH), 6.28 (q, 2H, CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 131 (CH), 130.0 (CH), 62.8 (CH_2) ppm.

8.9.37 Allgemeine Vorschrift für Oxidation mit MnO₂ & Wittig Reaktion insitu

Die Suspension aus 1.0 Äq des jeweiligen Alkohols in DCM wurde unter Argonfluß mit 20 Äq aktivierten Mangandioxid und 2.2 Äq von Ethoxy-(carbonylmethylene)-triphenylphosphoran gemischt. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gerührt. Anschließend wurde die Mischung über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das jeweilige Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (MPLC, SO₂, Cyclohexan/Ethylacetat 10:1).

8.9.38 Ethyl-(2E,4Z)-5-iodpenta-2,4-dienoat (27b)**Synthese**

Mangan(II)-oxid (10.1 g, 115.97 mmol, 12 Äq)

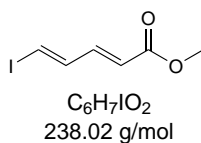
(Z)-3-Iod-prop-2-en-1-ol (**25b**) (1.8 g, 9.66 mmol, 1.0 Äq)

Ethyl-2-(triphenyl-15-phosphanylid-en)acetat (**26**) (3.7 g, 10.63 mmol, 1.1 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 88 % (2.1 g, 0.01 mmol)

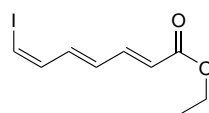
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (q, 3H, CH₃), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.90-6.13 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (t, 1H, CH), 7.14-7.17 (t, 1H, CH), 7.38-7.43 (d, 1H, CH) ppm.

8.9.39 Ethyl-(2E,4E)-5-iodpenta-2,4-dienoat (**27a**)

Eine Suspension aus Ethyl-(2E,4Z)-5-iodpenta-2,4-dienoat (**27b**) (0.52 g, 2.05 mmol, 1.0 Äq) und Iod (0.05 g, 0.201 mmol, 0.1 Äq) in Essigsäure (2 mL) wurde für 4 Stunden bei 30 °C gerührt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einer Mischung aus Cyclohexan/Diethylether (2:3) (20 mL) versetzt. Das Lösungsmittel wurde mittels Ko-Destillation unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 96 % (0.5 g, 1.97 mmol) isoliert werden.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 165 (CO), 129.5 (CH), 99.7 (CH), 51.6 (CH₃) ppm.

8.9.40 Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-iodohepta-2,4,6-trienoat (28b)



$C_9H_{11}IO_2$
278,09 g/mol

Mangan(II)-oxid (1.6 g, 22.5 mmol, 12 Äq)

(2E,4Z)-5-iodopenta-2,4-dien-1-ol (0.3 g, 1.4 mmol, 1.0 Äq)

Ethyl-2-(triphenyl-*I*-5-phosphanylid-en)acetat (**26**) (1 g, 3 mmol, 2.2 Äq)

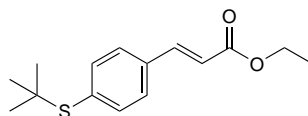
Lösungsmittel DCM

Aubeute 38 % (0.15 g, 0.541 mmol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.30 (q, 3H, CH_3), 4.25 (m, 2H, OCH_2), 5.95-6.0 (dd, 1H, CH), 6.56 (q, 1H, CH), 6.42-6.65 (m, 2H, CH), 7.08 (m, 1H, CH) 7.3 (q, 1H, CH) ppm.

DEPT 135 (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 143.7 (CH), 137.5 (CH), 130 (CH), 123 (CH), 87.5 (CH), 84.5 (CH), 60.5 (CH_2), 14.3 (CH_3) ppm.

8.9.41 Ethyl-(E)-3-(4-(*tert*-butylthio)pentyl)acrylat (37)



$C_{15}H_{20}O_2S$
264,38 g/mol

Synthese

4-(*tert*-Butylthio)benzaldehyd (**36a**) (0.29 g, 1.4 mmol, 1.0 Äq)

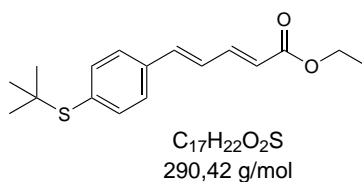
Ethyl-2-(triphenyl-*I*-5-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.63 g, 1.8 mmol, 1.2 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 70 % (0.28 g, 1 mmol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (q, 12H, $(CH_3)_4$), 4.26 (m, 2H, OCH_2), 6.4 (dd, 1H, CH), 7.4 (d, 1H, CH), 7.4-7.6 (m, 3H, CH), 7.7 (d, 1H, CH) ppm.

^{13}C -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.3 (CO), 144.2 (CH), 136.1 (CH), 132.7 (CH), 130.0 (CH), 120.3 (CH), 61.2 (CH), 31.6 (CH_2), 14.9 (CH_3) ppm.

8.9.42 Ethyl-(2E,4E)-5-(4-*tert*-butylthio)phenyl-penta-2,4-dienoat (39)**Synthese**

Mangan(II)-oxid (1.2 g, 13.8 mmol, 20 Äq)

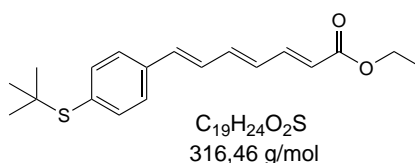
(E)-3-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)prop-2-en-1-ol (**38a**) (289 mg, 9.66 mmol, 1.0 Äq)Ethyl-2-(triphenyl-*l*-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.56 mg, 1.6 mmol, 1.1 Äq)

Lösungsmittel DCM

Aubeute 80 % (311 mg, 1 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (q, 12H, (CH₃)₄), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 6.0 (d, 1H, CH), 6.85-6.93 (d, 2H, CH), 7.43-7.5 (dd, 5H, CH), ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 140.5 (CH), 137.8 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (CH), 60.4 (CH₂), 46.7 (C_q), 30 (CH₃), 14.46 (CH₃) ppm.

8.9.43 Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)-hepta-2,4,6-trienoat (40)**Synthese**

Mangan(II)-oxid (0.6 g, 7 mmol, 23 Äq)

(2E,4E)-5-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)penta-2,4-dien-1-ol (**38b**) (0.085 g, 0.3 mmol, 1.0 Äq)Ethyl-2-(triphenyl-*l*-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.13 g, 0.4 mmol, 1.1 Äq)

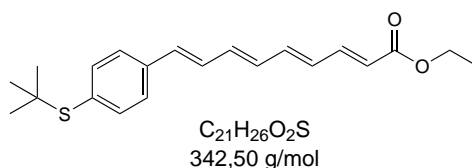
Lösungsmittel DCM

Aubeute 74 % (0.08 g, 0.25 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (q, 12H, (CH₃)₄), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.90 (d, 1H, CH), 6.4-6.5 (m, 1H, CH), 6.6-6.8 (q, 2H, CH), 6.9 (m, 1H, CH), 7.39 (m, 3H, CH) 7.48 (d, 2H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 144.4 (CH), 140.5 (CH), 137.8 (CH), 137.7 (CH), 137.3 (CH), 126.3 (CH), 60.4 (CH₂), 46.7 (C_q), 30 (CH₃), 14.46 (CH₃) ppm.

8.9.44 Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)-nona-2,4,6,8-tetraenoat (41)



Synthese

Mangan(II)-oxid (0.22 g, 2.5 mmol, 20 Äq)

(2E,4E,E6)-7-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-ol (**38c**) (0.034 g, 0.12 mmol, 1.0 Äq)

Ethyl-2-(triphenyl-*l*-5-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.05 g, 0.14 mol, 1.1 Äq)

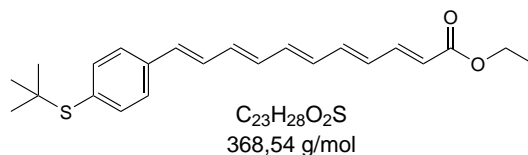
Lösungsmittel DCM

Aubeute 42 % (0.02 g, 0.05 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (q, 12H, (CH₃)₄), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.90 (d, 1H, CH), 6.3-6.7 (m, 5H, CH), 6.8-6.9 (m, 1H, CH), 7.38-7.5 (dd, 5H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 144.4 (CH), 140.5 (CH), 137.8 (CH), 137.7 (CH), 137.3 (CH), 132.8 (CH), 126.3 (CH), 60.4 (CH₂), 46.7 (C_q), 30 (CH₃), 14.46 (CH₃) ppm.

8.9.45 Ethyl-(2E,4E,6E,8E,10E)-11-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)-undeca-2,4,6,8,10-pentaenoat (42)



Synthese

Mangan(II)-oxid (0.1 g, 1.2 mmol, 20 Äq)

(2E,4E,6E,8E)-9-(4-(*tert*-butylthio)phenyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol (**38d**) (0.02 g, 0.06 mmol, 1.0 Äq)

Ethyl-2-(triphenyl-*l*-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.03 g, 0.07 mmol, 1.2 Äq)

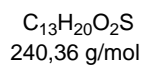
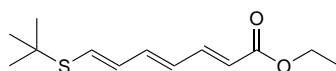
Lösungsmittel DCM

Aubeute 54 % (0.01 g, 0.03 mmol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (q, 12H, (CH₃)₄), 4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.90 (d, 1H, CH), 6.3-6.6 (m, 4H, CH), 6.6-6.7 (t, 2H, CH), 6.9 (dd, 1H, CH), 7.3-7.6 (m, 6H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 144.4 (CH), 140.5 (CH), 137.8 (CH), 137.7 (CH), 137.3 (CH), 135.5 (CH), 133.6 (CH), 132.8 (CH), 126.3 (CH), 60.4 (CH₂), 46.7 (C_q), 30 (CH₃), 14.46 (CH₃) ppm.

8.9.46 Ethyl-(2E,4E,6E)-7-(4-(*tert*-butylthio))-hepta-2,4,6-trienoat (34)



Synthese

Mangan(II)-oxid (0.42 g, 4.8 mmol, 10 Äq)

(2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dien-1-ol (**32b**) (0.08 g, 0.5 mmol, 1.0 Äq)

Ethyl-2-(triphenyl-*l*-phosphanylid-en)acetat (**26**) (0.2 g, 0.57 mmol, 1.2 Äq)

Lösungsmittel DCM

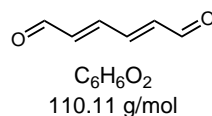
Aubeute 10 % (0.01 g, 0.05 mmol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.27-1.39 (m, 12H, $(CH_3)_4$), 4.19 (m, 2H, OCH_2), 5.90 (d, 1H, CH), 6.1-6.2 (dd, 1H, CH), 6.3-6.4 (dd, 1H, CH), 6.5-6.7 (m, 2H, CH), 7.26 (dd, 1H, CH) ppm.

^{13}C -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.3 (CO), 143 (CH), 138 (CH), 130.1 (CH), 122 (CH), 60.2 (CH_2), 46 (C_q), 30.2 (CH_3), 14.4 (CH_3) ppm.

8.9.47 Synthese des aktivierten Mangandioxid

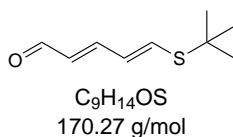
Zuerst wurde KMnO_4 (48 g) in 300 ml Wasser gelöst und auf 100 °C erhitzt. Gleichzeitig wurde $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (42 g) in 70.5 ml Wasser suspendiert und mit 35 ml NaOH-Lösung (40 %) versetzt. Dann wurde die MnSO_4 -Lösung tropfenweise innerhalb einer Stunde unter kräftigem Rühren zu der heißen KMnO_4 -Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Rühren wurde der ausgefallene braune Feststoff abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das braune Produkt wurde im Ofen über Nacht bei 100 °C getrocknet. Ausbeute 40 g.

8.9.48 (2E,4E)-Hexa-2,4-dienal (48)

Mangan(II)-oxid (6.07 g, 69.87 mmol, 24 Äq) wurde in abs. Dichlormethan (50 mL) unter Schutzgas suspendiert. Zu der Mischung wurde (2E,4E)-Hexa-2,4-dien-1,6-diol (**47**) (0.1 g, 0.56 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und der Ansatz wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit 66 % (0.21 g, 1.91 mmol) Ausbeute isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.86 (m, 2H, CH), 6.28 (q, 2H, CH), 10.11 (t, 2H, CHO) ppm.

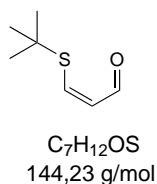
DEPT 135 (300 MHz, CDCl_3): δ = 195.2 (CHO), 150 (CH), 140 (CH) ppm.

8.9.49 (2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dienal (60)

Mangan(II)-oxid (0.59 g, 6.76 mmol, 12 Äq) suspendiert in abs. Dichlormethan (50 mL) wurde vorgelegt und unter Schutzgasatmosphäre mit (2E,4E)-5-(*tert*-Butylthio)penta-2,4-dien-1-ol (**32b**) (0.1 g, 0.5 mmol, 1.0 Äq) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, der Rückstand mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde mit 82 % (0.8 g, 0.56 mmol) Ausbeute erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.00-6.12 (d, 1H, CH), 6.31-6.47 (t, 1H, CH), 7.08 (m, 1H, CH), 7.45-7.72 (m, 1H, CH), 9.55 (d, 1H, CHO) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 193.2 (CHO), 138.2 (CH), 130 (CH), 129.2 (CH), 121.4 (CH), 46.8 (C_q), 30.4 (CH₃) ppm.

8.9.50 (Z)-3-(*tert*-Butylthiol)acrylaldehyd (52)**Synthese**

Mangan(II)-oxid (2.3 g, 32 mmol, 22 Äq)

(Z)-3-(*tert*-Butylthio)prop-2-en-1-ol (**32a**) (0.2 g, 1.4 mmol, 1 Äq)

Lösungsmittel THF

Ausbeute 70 % (0.14 g, 0.96 mmol)

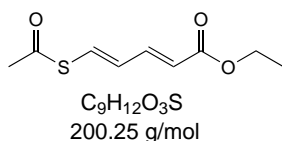
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.3 (q, 1H, CH), 7.7 (d, 1H, CH), 9.4 (d, 1H, CHO) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 189.6 (CHO), 138.2 (CH), 126.2 (CH), 46.8 (C_q), 30.4 (CH₃) ppm.

8.9.51 Allgemeine Vorschrift für die Einführung des Thioacetats am sp^2 -Kohlenstoff

Eine Lösung des jeweiligen Vinyljodids (1.0 Äq) in Acetonitril wurde mit Kaliumthioacetat (1.2 Äq) und einigen Tropfen DMF versetzt und für 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser gequencht und die Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

8.9.52 Ethyl-(2E,4E)-5-(acetylthio)-penta-2,4-dienoat (29)



Synthese

Ethyl-(2E,4Z)-5-iodopenta-2,4-dienoat (**27b**) (0.2 g, 0.8 mmol, 1.0 Äq)

Kaliumthioacetat (0.14 g, 1.2 mmol, 1.2 Äq))

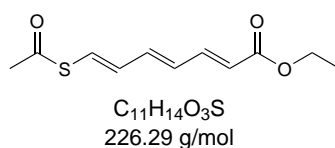
Lösungsmittel Acetonitril

SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat, 10:1

Ausbeute 90 % (0.14 g, 0.72 mmol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.26-1.32 (t, 3H, CH_3), 2.4 (s, 3H, CH_3) 4.16-4.23 (q, 2H, CH_2) 5.8 (d, 1H, CH) 6.5 (q, 1H, CH), 7.2 (d, 1H, CH), 7.3 (d, 1H, CH) ppm.

8.9.53 Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-(acetylthio)-hepta-2,4,6-trienoat (30)



Synthese

Ethyl-(2E,4E,6Z)-7-iodhepta-2,4,6-trienoat (**28b**) (0.1 g, 0.36 mmol, 1.0 Äq)

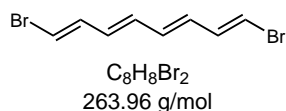
Kaliumthioacetat (0.08 g, 0.72 mmol, 1.2 Äq))

Lösungsmittel Acetonitril

SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat, 10:1

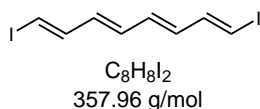
Ausbeute 15 % (0.012 g, 0.05 mmol)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.3 (t, 3H, CH_3), 2.4 (s, 3H, CH_3) 4.2 (q, 2H, CH_2) 5.9 (d, 1H, CH) 6.2-6.4 (m, 2H, CH), 6.5-6.65 (m, 1H, CH), 6.9 (d, 1H, CH) ppm.

8.9.54 (1E,3E,5E,7E)-1,8-Dibromoocta-1,3,5,7-tetraen (49)

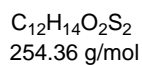
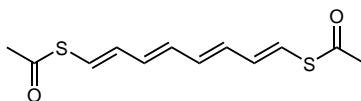
(Bromomethyl)-triphenylphosphoniumbromid (4.1 g, 0.01 mol, 2.1 Äq) gelöst in THF (25 ml) wurde portionsweise bei -78 °C mit Kalium-*tert*-Butoxid (1.1 g, 0.01 mol 2.1 Äq) versetzt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Dann wurde die Lösung von (2E,4E)-Hexa-2,4-diene-1,6-dialdehyde (**48**) (0.3 g, 4.5 mmol) in geröcknetem THF zum Reaktionsansatz über 20 min zugetropft. Nach 90 min Rühren bei -78 °C wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurden 50 ml einer 5%-Natriumhydrogencarbonat-Lösung zum Gemisch zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit *n*-Pentane (3x15 ml) extrahiert. Der in der organischen Phase ausgefallene farblose Feststoff wurde über einen Faltenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (MPLC, SiO₂, Hexan/Ethylacetat, 10:1). Ausbeute (0.2 g, 20 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.19-6.38 (m, 2H, CH) 6.38-6.42 (m, 2H, CH), 6.5 (d, 1H, CH), 6.56-6.81 (m, 4H, CH) ppm.

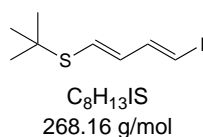
8.9.55 (1E,3E,5E,7E)-1,8-Diiodoocta-1,3,5,7-tetraen (50)

Zu einer Lösung von (**48**) (0.42 mg, 1.6 mmol) in 25 ml DMF wurden KI (0.88 g, 5 mmol) und CuI (0.5 mg, 3 μmol) zugegeben. Die Mischung wurde bei 140 °C für 6 Stunden gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit einer 1 N HCl angesäuert (pH 2) und mit Diethylether (3x5 ml). Die organische Phase wurde mit gesättigter Na₂S₂O₃-Lösung (10 ml) und Natriumchlorid-Lösung (10 ml) gewaschen. Dann wurde die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit 73 % (0.42 g, 1.2 mmol) Ausbeute isoliert und ohne weitere Reinigung umgesetzt. Das NMR-Spektrum ist identisch mit dem NMR-Spektrum von (**48**).

8.9.56 S,S-((1E,3E,5E,7E)-octa-1,3,5,7-tetraen-1,8-diyl)-diethanthioat (51)



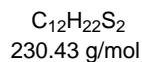
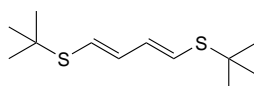
Eine Mischung aus (**50**) (0.055 g, 0.15 mmol), Kupferiodid (0.002 g, 5 mol%), Kaliumcarbonat (0.04 g, 0.3 mmol, 2 Äq) und Ethylenglukol (0.02 ml) wurde in Isopropanol (5 ml) aufgenommen und auf 80 °C für 24 Stunden erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Wasser versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (3x10 ml) wurde die gesammelte organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert.

8.9.57 *tert*-Butyl-(1E,3E)-4-iodobuta-1,3-dien-1-yl)sulfan (53)

(Iodomethyl)-triphenylphosphoniumiodid (0.4 g, 0.8 mmol) wurde in DCM (15 ml) vorgelegt und bei -78 °C portionsweise mit Kalium-*tert*-butanolat (0.08 g, 0.7 mmol) versetzt. Nach einer Stunde Rühren wurde zum Gemisch eine Lösung von Z-3-(*tert*-Butylthio)acrylaldehyd (**50**) (0.07 g, 0.5 mmol) in DCM (5 ml) bei -78 °C zugetropft und eine weitere Stunden bei gleicher Temperatur gerührt. Dann wurde der Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur gebracht und für 2 weitere Stunden reagieren gelassen. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige mit DCM (3x5 ml) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.1 (d, 2H, CH), 6.16-6.27 (q, 1H, CH), 6.4-6.5 (m, 1H, CH), 6.6 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 138.2 (CH), 136.4(CH), 122 (CH), 94 (CH), 46.8 (C_q), 30.4 (CH₃) ppm.

8.9.58 (1E,3E)-1,4-bis(*tert*-Butylthio)buta-1,3-dien (54)

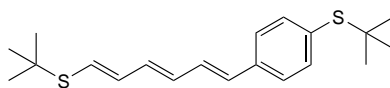
Natrium (0.002 g, 0.1 mmol) wurde mit Ethanol (10 ml) bis zum vollständigen Auflösen gerührt. Dann wurde *tert*-Butylmercaptan (0.01 g, 0.1 mmol) zum Reaktionsansatz zugegeben und die Mischung wurde eine Stunde gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butyl-(1E,3E)-4-iodobuta-1,3-dien-1-yl)sulfan (**51**) (0.023 g, 0.09 mmol) zugegeben und die Reaktion wurde für 2 weitere Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde Ethanol unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in THF aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x5 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch (MPLC, SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, Gradient 5 %) gereinigt.

Das Produkt wurde mit 25 % (5 mg, 0.02 mmol) Ausbeute isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃), 6.18 (m, 2H, CH), 6.4 (d, 1H, CH), 6.7 (d, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 138.2 (CH), 138.2(CH), 122 (CH), 122 (CH), 46.8 (C_q), 30.4 (CH₃) ppm.

8.9.59 tert-Butyl(4-((1E,3E,5E)-6-(tert-butylthio)hexa-1,3,5-trien-1-yl)phenyl)sulfan (61)



$C_{20}H_{28}S_2$
332.56 g/mol

Synthese I

Natriumhydrid (0.007 g, 0.31 mmol, 1.05 Äq)

Diethyl-((2E,4E)-5-(tert-Butylthio)penta-2,4-dien-1-yl)-phosphonat (**59**) (0.09 g, 0.3 mmol, 1.0 Äq)

4-(tert-Butylthio)benzaldehyd (**36a**) (0.06 g, 0.3 mmol, 1.0 Äq)

Lösungsmittel THF

SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1

Synthese II

Natriumhydrid (0.007 g, 0.31 mmol, 1.05 Äq)

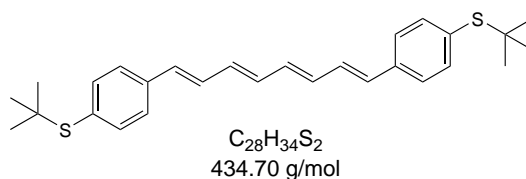
Diethyl-(4-(tert-butylthio)-benzyl)phosphonat (**57**) (0.09 g, 0.28 mmol, 1.0 Äq)

(2E,4E)-5-(tert-Butylthio)penta-2,4-dienal (**60**) (0.06 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq)

Lösungsmittel THF

SiO₂, Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1

8.9.60 (1E,3E,5E,7E)-1,8-bis(4-(*tert*-Butylthio)phenyl)octa-1,3,5,7-tetraen (62)



Synthese I

Natriumhydrid (0.015 g, 0.62 mmol, 2.66 Äq)

Diethyl-(4-(*tert*-butylthio)-benzyl)phosphonat (**57**) (0.19 g, 0.60 mmol, 2.5 Äq)

(2E,4E)-Hexa-2,4-diendial (**48**) (0.03 g, 0.27 mmol, 1.0 Äq)

Lösungsmittel THF

Synthese II

Diethylamin (0.02 mL, 0.16 mmol, 2.2 Äq)

n-Butyllithium (0.1 mL, 0.16 mmol, 2.2 Äq)

Diethyl-(4-(*tert*-butylthio)benzyl)phosphonat (**57**) (0.05 g, 0.16 mmol, 2.2 Äq)

(2E,4E)-Hexa-2,4-diendial (**48**) (0.008 g, 0.07 mmol, 1.0 Äq)

Lösungsmittel THF

8.9.61 Dimer-Synthese

Die zu präparierenden Glasträger wurden zuerst mittels einer 15 %igen-wässrigen RBS-Lösung bei 90 °C und Ultraschallbeschallung gereinigt sowie daraufhin im Stickstoffgasstrom getrocknet. Die Träger wurden anschließend in einer 5 pM Goldnanopartikel Dispersion bei 30 °C über 18 Stunden inkubiert. Durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbieren die CTAB stabilisierten positiv geladenen Nanopartikel an der Glasoberfläche des Trägers, da die Silan-Gruppen aufgrund der basischen Reinigung deprotoniert wurden und daher eine negative Ladung aufweisen. Die mit Nanopartikel beschichteten Glasträger wurden anschliessend mehrmals mit Wasser und Ethanol gewaschen und in eine Lösung von 1 mM Natriumbromid, 1 mM Octandithiol und Ethyl-(2E,4E)-5-(*tert*-butylthio)penta-2,4-dienoat (**33**) in Ethanol für 90 min bei 30 °C getaucht. Durch die Änderung der Ionenstärke des Lösungsmittels durch Natriumbromid, sowie die polar protischen Eigenschaften des Ethanols kann eine Destabilisierung der CTAB-Schicht herbeigeführt werden damit die Thiol-Gruppen des Kopplungsmoleküls, sowie von **33** mit der Goldoberfläche der Nanopartikel reagieren können. Daraufhin wurden die Glasträger mit Ethanol und Wasser gewaschen und in einer Dispersion aus 20 pM Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln und in Wasser für 4 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Glasträger wurden in eine 1 mM MUTMAB [(11-Mercaptoundecyl)-N,N,N-trimethylammonium bromide]-Ethanol-Lösung getaucht um die freien Stellen der Oberfläche der Goldnanopartikel zu schützen. Abschließend wurden die Glasträger erneut mit Ethanol gewaschen und Extinktionsspektren in Ethanol gemessen. Ein Teil der Probe wird im Stickstoffgasstrom für die REM-Aufnahmen getrocknet. Diese werden anschliessend mit 2 nm Platin besputtert, um das Glassubstrat für die Messung leitfähig zu machen. Die Desorption der Nanopartikel von den Glasträgern erfolgre durch Ultraschallbehandlung in 10 μ M MUTMAB-Ethanol-Lösung. Für eine TEM-Aufnahmen wurden das Kolloid als eine 4 μ M-Lösung auf ein Kupfer-Netz mit Kohlenstoff-Schicht aufgetragen.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Exemplarische Darstellung der thiolierten Rhodamine	3
2.2	Exemplarische Darstellung der thiolierten Polyene	4
3.1	Energieniveauschema für elastische (Rayleigh) und inelastische (Stokes und Anti-Stokes) Raman-Streuung.	6
3.2	Schematische Darstellung der Entstehung eines lokalisierten Oberflächenplasmons. Das elektrische Wechselfeld E_0 mit der Frequenz ω_{inc} regt die Leitungsbandelektronen des Metalls zu Schwingung an.	9
3.3	Schematische Darstellung der SERS-Verstärkung am Metall-Nanopartikel.	10
3.4	Schematische Darstellung des Resonanz-Raman-Effektes. Links: Resonanz-Stokes-Streuung, rechts: Resonanz-Anti-Stokes-Streuung.	12
4.1	A: Nahinfrarot-Raman-Farbstoff für Multiplex-SERRS ^[51, 52] ; B: Benzotriazol-basierter Farbstoff für Mehrfarben-DNA-Experimente ^[47] ; C: Alkin-basierter thiolierter Raman-Farbstoff für SERS an Gewebeschnitten ^[39] ; D: Chalcogenopyrylium-basierter Farbstoff für SERRS ^[53]	14
5.1	Synthesewege des thiolierten Rhodamins 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1). Ausgangssubstanz ist 5,6-Carboxyrhodamin (2).	17
5.2	Synthese der 4-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (2).	18
5.3	Synthese von 4-(3,6-Diamino-4-sulfonylchloride-5-sulfo-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (1) über Alexa 488 (6) als Zwischenstufe, ausgehend von (2).	18
5.4	Herstellungsschema von 4-(3,6-Diamino-4,5-dimercapto-9H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (1) mittels Triphenylphosphin/Iod Reduktion. Der Syntheseweg über 8 war nicht möglich. Dafür war der synthetischer Weg über die Zwischenstufe 7 erfolgreich.	19
5.5	Übersicht von synthetisierten Cysteamin-modifizierten Rhodamin-Derivaten.	20
5.6	Synthese von 4-(3,6-Diamino-4,5-bis[(2-sulfanylethyl)sulfamoyl]-9H-xanthen-9-yl)benzol-1,3-dicarbonsäure (5).	21
5.7	Synthese von 2-(3,6-Diamino-9H-xanthen-9-yl)-5-[2-sulfanylethyl]carbamoyl benzoesäure (3).	21
5.8	Synthese von 6-Amino-9-(2-carboxy-4-((2-mercaptoethyl)carbamoyl)phenyl)-4,5-dimercapto-3H-xanthen-3-iminium (4).	21

5.9	SERS-Spektren der untersuchten Substanzen. A: 4-MBA@AuNP (schwarze Linie), DTNB@AuNP (rote Linie) und ATP@AuNP (blaue Linie); B: Anilin@AgNP (grüne Linie), 3-AP@AgNP (olivgrüne Linie); C: 4-MBA@AgNP (schwarze Linie), DTNB@AgNP (rote Linie); D: 3-AP@AuNP (olivgrüne Linie), 2-AP@AuNP (violette Linie), Anilin@AuNP (grüne Linie). Es wurden PVP-stabilisierte AuNP (60 nm) und Citrat-stabilisierte AgNP (70 nm) verwendet. Spektrale Auflösung 1800 g/mm, Integrationszeit 10 s, Leistung des Lasers 12 mW, HeNe-Laser 632.8 nm.	22
5.10	Links: SERS-Spektren von CRhSH@AgNP (schwarz), CRhSH-Cys@AgNP (grün) und CRh-Cys@AgNP (blau). Normierung auf die Raman-Bande von Ethanol bei ca. 880 cm^{-1} (rot). Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 10 mW. Integrationszeit 10 s mit drei Koadditionen. Die Spektren sind ohne Basislinienkorrektur dargestellt. Rechts: Extinktionsspektren der AgNP nach der Inkubation mit den jeweiligen Raman-Reportern, CRhSH@AgNP (schwarz), CRhSH-Cys@AgNP (rot) und CRh-Cys@AgNP (blau).	24
5.11	DFT berechnete Raman-Spektren von 5,6-Carboxyrhodamin (2) und von dem thiolierten Rhodamin (1). Theorieniveau: B3LYP/6-311G++ (d,p), Skalierungsfaktor 0.97.	25
5.12	Molekulare elektrostatische Potentiale von 5,6-Carboxyrhodamin (2) (links) und von dem thiolierten Rhodamin (1) (rechts). Methode für die Optimierung der Molekülstrukturen: DFT, B3LYP/6-311G+(d,p).	28
5.13	Absorptionsspektren von CRh (2), CRhSH (1) und Rhodamin 6G (1 mM Lösung in Ethanol).	29
5.14	Gold-Nanosterne: links Extinktionsspektrum $\lambda_{max} = 490\text{ nm}$, rechts: TEM-Aufnahmen von Au-Nanosterne mit einer Größe von ca. 70 nm.	30
5.15	SERS-Spektren von CRhSH (1) und CRh (2) auf Au-Nanosternen. Integrationszeit von 10 s, Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 10 mW.	31
5.16	Einzelpartikel-Experimente mit Au-Nanosternen. A: SERS-Spektrum von CRh (2); B: SERS-Spektrum von CRhSH (1); C und D: Falschfarben-Bilder, basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Reporter-Bande bei 1200 cm^{-1} ; E: REM-Aufnahme für die CRh@AuNS Probe. Die SERS-Spektren wurden auf die Si-Phononbande bei 520 cm^{-1} normiert. Integrationszeit 2 s, Leistung 0.3 mW, Anregungswellenlänge 632.8 nm.	32
5.17	A: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Au-Film, 10x Objektiv mit NA = 0.25, Integrationszeit 2 s, Leistung $300\text{ }\mu\text{W}$. Grüne Punkte AuNP, helle gelbe Punkte Löcher; B: Extinktionsspektrum der super-sphärischen AuNP (CTAB-stabilisiert), $\lambda_{max} = 525\text{ nm}$; C: Schematische Darstellung des AuNP@Au-Substrates.	33
5.18	SERS-Spektren von CRhSH (1), CRh (2) und Rhodamin 6G auf AuNP@Au-Film. Integrationszeit 2 s, Leistung $300\text{ }\mu\text{W}$, Anregungswellenlänge 632.8 nm.	34
5.19	REM-Aufnahmen der AuNP-Filme immobilisiert auf Silizium-Träger links: AuNP mit APTMS-Funktionalisierung, rechts: AuNP ohne APTMS-Funktionalisierung.	35

5.20 SERS-Experimente mit AuNP@Si-Substrat. A: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für CRhSH (1), B: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für Rhodamin 6G, C: Dunkelfeld-Aufnahme von AuNP@Si für 4-MBA, D: REM-Aufnahme von AuNP@Si für CRhSH (1), E: REM-Aufnahme von AuNP@Si für Rhodamin 6G, F: REM-Aufnahme von AuNP@Si für 4-MBA, G: SERS-Spektren von CRhSH (1) auf AuNP@Si, H: SERS-Spektren von Rhodamin 6G auf AuNP@Si, I: SERS-Spektren von 4-MBA auf AuNP@Si. Anregungswellenlänge 632.8 nm, Leistung 70 μ W, Integrationszeit 10 s.	36
5.21 SERRS-Experimente von CRhSH (1) und R6G auf AuNP@Si für die blaue Anregungswellenlänge (488 nm). Leistung 20 mW, Integrationszeit 60 s. Oben: Rohspektren; unten: Fluoreszenzhintergrund korrigierte und auf die Bande bei 520 cm^{-1} (Silizium) normierte Spektren.	37
5.22 SERS-Experimente mit AuNP@Si-Substraten. A: Falschfarben-Bild von AuNP@Si für CRhSH (1), basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Bande bei 1200 cm^{-1} ; C: Falschfarben-Bild von AuNP@Si für R6G, basierend auf der SERS-Intensität der Raman-Bande bei 1200 cm^{-1} ; B: gemittelte SERS-Spektren von CRhSH (1); D: gemittelte SERS-Spektren von R6G. Die graue Schattierung verdeutlicht die Standardabweichung. Schrittweite 300 nm, Integrationszeit 1 s, Leistung 70 μ W, Anregungswellenlänge 632.8 nm.	38
5.23 Schematische Darstellung der thiolierten Rhodamine	38
5.24 Synthesestrategie zur Herstellung von vinylischen Thioacetat modifizierte Polyenen (23) und (24).	41
5.25 Syntheseschritte für den Aufbau von vinylischen Polyenkette und die Einführung der Acetyl-geschützten Thiolgruppe an einem Polyen-Terminus mittels einer Horner-Emmons Reaktion.	42
5.26 Synthesestrategie zur Herstellung von vinylischen Thioacetat-modifizierten Polyenen (29) und (30).	42
5.27 Syntheseschritte für den Aufbau einer vinylischen Polyenkette und die Einführung der Acetyl-geschützten Thiolgruppe mittels einer nucleophilen Substitution an einem sp^2 -Kohlenstoff.	43
5.28 Syntheseübersicht zur Herstellung von vinylischen Polyenen (33) und (34).	43
5.29 Syntheseübersicht für die Herstellung von phenylischen Polyenkette mittels Wittig-Reaktion und die Einführung einer <i>tert</i> -Butyl-geschützten Thiolgruppe mittels nucleophilen Substitution am Aromaten. m gibt die Anzahl der Doppelbindungen des jeweiligen Polyens. Die Charaterisierung der synthetisierten allylischen Alkohole 38b , 38c und 38d ist bei den Synthesevorschriften zu finden.	45
5.30 Syntheseschritte für die Herstellung von phenylischen Polyenkette mittels einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion.	45
5.31 Synthetisierte vinylischen Polyene AcS-2DB (29), AcS-3DB (30), ^tBuS -2DB (33) und ^tBuS -3DB (34).	46
5.32 Links: Raman-Spektren von Acetyl-geschütztem Polyen AcS-2DB (29); rechts: Raman-Spektren von 4-MBA. Die Spektren sind auf die Ethanol-Bande bei 887 cm^{-1} normiert. Integrationszeit 20 s, Leistung 10 mW, Anregungswellenlänge 632.8 nm.	47

5.33	Links oben: Extinktionsspektren der AuNS nach der Inkubation mit AcS-3DB (30), AcS-2DB (29) und 4-MBA; rechts oben: Extinktionsspektren der Au/Ag-Nanoschallen nach der Inkubation mit AcS-3DB (30), AcS-2DB (29) und 4-MBA; links unten: SERS-Spektren von AcS-3DB (30), AcS-2DB (29) und 4-MBA mit AuNS; rechts unten: SERS-Spektren von AcS-3DB (30), AcS-2DB (29) und 4-MBA mit Au/Ag-Nanoschallen. Integrationszeit 20 s, Leistung 10 mW, Laseranregungswellenlänge 632.8 nm.	48
5.34	Links: Absorptionsspektren von 10 μ M ethanolischen Lösungen der vinylischen Polyene ^t BuS-2DB (33) und ^t BuS-3DB (34), rechts: DFT-berechneten Absorptionsspektren der vinylischenn Polyene ^t BuS-2DB (33) und ^t BuS-3DB (34).	49
5.35	Raman-Spektren der vinylischen Polyene ^t BuS-2DB (33) und ^t BuS-3DB (34). Links oben: DFT berechnete Raman-Spektren; rechts oben: gemessene Raman-Spektren bei roter Laseranregung 632.8 nm, Integrationszeit 10 s, Leistung 100 μ W; Mitte unten: gemessene Raman-Spektren bei blauer Laseranregung 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 20 mW. Die Proben wurden als Pulver untersucht.	50
5.36	SERS-Experimenten mit AuNP@Au-Substraten. Links: SERS-Spektrum von ^t BuS-2DB (33), rechts: SERS-Spektrum von ^t BuS-3DB (34). Integrationszeit von 10 s, Leistung 900 μ W, Anregungswellenlänge von 632.8 nm.	51
5.37	Synthetisierte phenylische thiolierte Polyene (39) ^t BuSPh-2DB, (40) ^t BuSPh-3DB, (41) ^t BuSPh-4DB, (42) ^t BuSPh-5DB.	52
5.38	Links: Raman-Spektren der phenylischen Polyene (Feststoffe, Laserlichtwellenlänge 632.8 nm. Integrationszeit 5 s, Leistung 10 mW), rechts: DFT-berechnete Raman-Spektren (Gasphase, B3LYP-6311++ (d,p), Skalierungsfaktor 0.97), unten: Auftragung der Anzahl der C=C-Doppelbindungen gegen die Wellenzahlposition der C=C-Streckschwingung.	53
5.39	Normierte Raman-Spektren von 1 mM ethanolischen Lösung von phenylischen Polyenen 39 , 40 , 41 und 42 . Links: Laserlichtwellenlänge 632.8 nm, Integrationszeit 10 s, Leistung 12 mW, rechts: Laserlichtwellenlänge 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 20 mW.	54
5.40	Normierte Raman-Spektren von 1 mM ethanolischen Lösung von phenylischen Polyenen 39 , 40 , 41 und 42 und 4-MBA. Laserlichtwellenlänge 488 nm, Integrationszeit 60 s, Leistung 10 mW.	55
5.41	Oben: simulierten Absorptionsspektren der phenylischen Polyene 39 (^t BuSPh-2DB), 40 (^t BuSPh-3DB), 41 (^t BuSPh-4DB) und 42 (^t BuSPh-5DB), unten: Absorptionsspektren von 10 μ M ethanolischen Lösungen.	56
5.42	Links: normiertes Extinktionsspektrum der AuNS, rechts: TEM-Aufnahme der für die SERS-Experimente verwendeten AuNS.	57
5.43	Links: SERS-Spektren der phenylischen Polyene 39 (^t BuSPh-2DB), 40 (^t BuSPh-3DB), 41 (^t BuSPh-4DB) und 42 (^t BuSPh-5DB) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm, Integrationszeit 120 s, Leistung 100 mW; rechts: SERS-Spektren von 39 (^t BuSPh-2DB), 40 (^t BuSPh-3DB), 41 (^t BuSPh-4DB) und 42 (^t BuSPh-5DB) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 632.8 nm, Integrationszeit 20 s, Leistung 12 mW.	58

5.44 Syntheseschritte für die Herstellung des dithiolierten Acetyl-geschützten Polyens (51).	58
5.45 Synthese des dithiolierten <i>tert</i> -Butyl-geschützten Polyens (54).	60
5.46 Syntheseübersicht für die Herstellung von dithiolierten <i>tert</i> -Butyl-geschützten Polyenen (61) und (62) mittels Horner-Emmons-Reaktion.	61
5.47 Synthesen von Methyl-(2E,4Z)-6-(diethoxyphosphoryl)hexa-2,4-dienoat (59) und Diethyl-(4-(<i>tert</i> -butylthio)benzyl)phosphonat (57).	62
5.48 Oben links: Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahme der AuNP-Dimere verbrückt über dual-SAM aus 1,8-Octandithiol und Polyen 33 auf Kupfernetz mit Kohlenstofffilm. Oben rechts: Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme der AuNP-Dimer Probe auf Glas, besputtert mit 2 nm Pt (helle Stippen im REM-Bild. Unten links: Darstellung der <i>hot spots</i> der synthetisierten Dimere mit 1,8-Octandithiol als Koppungsmolekül (blau) und 33 als Raman-Reporter (rot). Unten rechts: Normiertes Extinktionsspektrum der Goldnanopartikel-Dimere, gemessen in einem Bereich von 350 bis 900 nm. Die Extinktionsmaxima der Nanostrukturen liegen bei $\lambda_{max,tra} = 527$ nm und $\lambda_{max,lon} = 711$ nm.	63
5.49 Links oben: Aufgenommenes SERS-Spektrum (10 s Integrationszeit, Laserleistung 30 μ W, 100-fache Vergrößerung). Links Mitte: Raman-Spektrum (10 s Integrationszeit, Laserleistung 30 μ W, 100-fache Vergrößerung). Links unten: theoretisch berechnetes Raman-Spektrum von 33 . Rechts oben: Raman-Spektren von 1,8-Octandithiol (C_8) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).	64
5.50 Synthetisierte thiolierte Polyene	65
5.51 Links oben: Auftragung der Raman-Intensitäten der C=C-Streckschwingung bei ca. 1600 cm^{-1} aller synthetisierten Polyene 39 , 40 , 41 und 42 gegen die Anzahl der Doppelbindung. Rechts oben: Ausschnitt der Auftragung von Raman-Signalintensitäten der C=C-Streckschwingung bei ca. 1600 cm^{-1} für die vinylischen und phenylischen Polyene mit zwei und drei Doppelbindungen. Die Spektren sind auf die 887 cm^{-1} Bande von Ethanol normiert und bei zwei Laseranregungswellenlängen von 488 nm und 632.8 nm vermessen. Links unten: Auftragung der Raman-Signalverschiebung der C=C-Streckschwingung gegen die Anzahl der C=C-Doppelbindungen. Rechts unten: Auftragung der Absorptionsmaxima der synthetisierten Polyene gegen die Anzahl der Doppelbindungen. Für die phenylischen Polyene 39 , 40 , 41 und 42 wird die Anzahl der Doppelbindungen ohne Berücksichtigung des Phenylrings betrachtet.	66
8.1 Schematischer Aufbau eines konfokalen Raman-Mikroskops und die Darstellung des Strahlengangs im Raman-Modus.	76
8.2 Schematische Darstellung des Strahlengangs im Hell-/Dunkelfeld-Modus.	77

Tabellenverzeichnis

5.1	Raman-Banden­zuordnung für thioliertes Rhodamin (1) und 5,6-Carboxyrhodamin (2) (B3LYP/6-311G++(d,p), Skalierungsfaktor 0.97). ν_s symmetrische Streck­schwin­gung, ν_a antisymmetrische Streck­schwin­gung, δ_{def} Deformationsschwin­gung, δ_{sc} Scherschwin­gung, ρ Schau­ckelschwin­gung.	27
5.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften von CRhSH (1), CRh (2) und Rhodamin 6G.	29
5.3	Raman-Banden­zuordnung für die vinylischen Polyene (33) und (34), (B3LYP/6-311G++(d,p), Skalierungsfaktor 0.97). ν_s symmetrische Streck­schwin­gung, ν_a antisymmetrische Streck­schwin­gung, δ_{def} Deformationsschwin­gung.	50
5.4	Raman-Banden­zuordnung für die phenylischen Polyene (39), (40), (41) und (42), (B3LYP/6-311G++(d,p)). ν_s symmetrische Streck­schwin­gung, ν_a antisymmetrische Streck­schwin­gung, δ_{def} Deformationsschwin­gung.	54
8.1	Chemikalien	74

Literaturverzeichnis

- [1] Clendinnen, I. The Sacred. In *Aztecs: An Interpretation*; Canto Classics Cambridge University Press: New York, 2014.
- [2] Acuna, A.; Amat-Guerri, F. Early history of solution fluorescence: the Lignum nephriticum of Nicolas Monardes. In *Fluorescence of supermolecules, polymers, and nanosystems*; Springer: Berlin Heidelberg, 2007.
- [3] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 731-738.
- [4] Brightman, R. *Nature* **1956**, *177*, 815-821.
- [5] Baeyer, A. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1871**, *4*, 555-558.
- [6] Meyer, R. Über Einige Beziehungen Zwischen Fluorescenz und Chemischer Constitution. In *Fest-Schrift der Herzoglichen Technischen Hochschule Carolo-Wilhelmina*; Springer: Berlin Heidelberg, 1897.
- [7] Rost, F. W. *Fluorescence microscopy*; volume 2 Cambridge University Press: New York, 1992.
- [8] Coons, A. H.; Creech, H. J.; Jones, R. N.; Berliner, E. *J. Immunol.* **1942**, *45*, 159-70.
- [9] Lesaicherre, M.-L.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2085-2088.
- [10] Krutzik, P. O.; Nolan, G. P. *Nature methods* **2006**, *3*, 361-368.
- [11] Schlücker, S.; Küstner, B.; Punge, A.; Bonfig, R.; Marx, A.; Ströbel, P. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 719-721.
- [12] Cao, Y. C.; Jin, R.; Mirkin, C. A. *Science* **2002**, *297*, 1536-1540.
- [13] Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
- [14] Dulkeith, E.; Morteaux, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S. A.; van Veggel, F. C.; Reinhoudt, D. N.; Moller, M.; Gittins, D. I. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 203002.
- [15] Cao, Y. C.; Jin, R.; Nam, J.-M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14676-14677.
- [16] Schaffer, H.; Chance, R.; Silbey, R.; Knoll, K.; Schrock, R. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 4161-4170.
- [17] Blackie, E. J.; Ru, E. C. L.; Etchegoin, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14466-14472.
- [18] Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, *330*, 377-445.

- [19] Raman, C.; Krishnan, K. *Nature* **1928**, *121*, 501.
- [20] Smekal, A. *Naturwissenschaften* **1923**, *11*, 873-875.
- [21] Landsberg, G. Z. *Phys. A Hadrons and Nuclei* **1927**, *43*, 773-778.
- [22] Haken, H.; Wolf, H. C. *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2013.
- [23] Pawley, J.; Masters, B. R. *Optical Engineering* **1996**, *35*, 2765–2766.
- [24] Mulvaney, P. *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 699-699.
- [25] Schlücker, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4756-4795.
- [26] Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163-166.
- [27] Moskovits, M.; Suh, J. S. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5526-5530.
- [28] Moskovits, M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783-826.
- [29] Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84*, 1-20.
- [30] Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215-5217.
- [31] Schlücker, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4756-4795.
- [32] Kennedy, B. J.; Spaeth, S.; Dickey, M.; Carron, K. T. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3640-3646.
- [33] Nie, S.; Emory, S. R. *Science* **1997**, *275*, 1102-1106.
- [34] Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. *J. Phys. Chem.. C, Nanomaterials and interfaces* **2008**, *2008*, 18849-18859.
- [35] Xie, W.; Herrmann, C.; Kömpe, K.; Haase, M.; Schlücker, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19302-19305.
- [36] Kühler, P.; Weber, M.; Lohmüller, T. *ACS App. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8947-8952.
- [37] Katrin, K.; Harald, K.; Irving, I.; Ramachandra, R. D.; Michael, S. F. *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, *14*, R597.
- [38] Otto, A. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 497-509.
- [39] Schütz, M.; Muller, C. I.; Salehi, M.; Lambert, C.; Schlücker, S. *J. Biophotonics* **2011**, *4*, 453-63.
- [40] Creighton, J. A. *Surf. Sci.* **1985**, *158*, 211-221.
- [41] Clark, R. J. H.; Stewart, B. The resonance raman effect—Review of the theory and of applications in inorganic chemistry. In *Inorganic Chemistry and Spectroscopy*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1979.

- [42] Kramers, H. A.; Heisenberg, W. Z. *Phys. A Hadrons and Nuclei* **1925**, 31, 681-708.
- [43] Heisenberg, W. Z. *Phys.* **1925**, 33, 879-893.
- [44] Baierl, P.; Kiefer, W. *J. Raman Spectrosc.* **1981**, 10, 197-204.
- [45] Schlücker, S. *Chem. Phys.Chem.* **2009**, 10, 1344-1354.
- [46] Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M. *Small* **2010**, 6, 604-610.
- [47] Graham, D.; Faulds, K.; Smith, W. E. *Chem. Commun. (Camb.)* **2006**, 4363-71.
- [48] Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4903-4908.
- [49] Jehn, C.; Küstner, B.; Adam, P.; Marx, A.; Strobel, P.; Schmuck, C.; Schlücker, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 7499-7504.
- [50] Jehn, C.; Küstner, B.; Adam, P.; Marx, A.; Strobel, P.; Schmuck, C.; Schlücker, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 7499-7504.
- [51] Samanta, A.; Maiti, K. K.; Soh, K. S.; Liao, X.; Vendrell, M.; Dinish, U. S.; Yun, S. W.; Bhuvaneswari, R.; Kim, H.; Rautela, S.; Chung, J.; Olivo, M.; Chang, Y. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 6089-92.
- [52] Maiti, K. K.; Samanta, A.; Vendrell, M.; Soh, K. S.; Olivo, M.; Chang, Y. T. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, 47, 3514-6.
- [53] Harmsen, S.; Bedics, M. A.; Wall, M. A.; Huang, R.; Detty, M. R.; Kircher, M. F. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6570.
- [54] Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W. Y.; Haugland, R. P. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 47, 1179-88.
- [55] Pristinski, D.; Tan, S.; Erol, M.; Du, H.; Sukhishvili, S. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 762-770.
- [56] Shim, S.; Stuart, C. M.; Mathies, R. A. *Chem. Phys. Chem.* **2008**, 9, 697-9.
- [57] Zhang, W.; Yeo, B. S.; Schmid, T.; Zenobi, R. *Phys. J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 1733-1738.
- [58] Sackrow, M.; Stanciu, C.; Lieb, M. A.; Meixner, A. J. *Chem. Phys.Chem.* **2008**, 9, 316-320.
- [59] Dieringer, J. A.; Lettan, R. B.; Scheidt, K. A.; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 16249-16256.
- [60] Li, P.; Zhou, X.; Liu, H.; Yang, L.; Liu, J. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, 44, 999-1003.
- [61] Yajima, T.; Yu, Y.; Futamata, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 12454-12462.
- [62] Zengin, G.; Gschneidner, T.; Verre, R.; Shao, L.; Antosiewicz, T. J.; Moth-Poulsen, K.; Käll, M.; Shegai, T. *Phys. J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 20588-20596.
- [63] Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 578-580.

- [64] Macernis, M.; Galzerano, D.; Sulskus, J.; Kish, E.; Kim, Y.-H.; Koo, S.; Valkunas, L.; Robert, B. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 56-66.
- [65] Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. *Biochemistry* **1977**, *16*, 819-828.
- [66] Klein, D.; Kiliçkiran, P.; Mlynek, C.; Hopf, H.; Dix, I.; Jones, P. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10507-10522.
- [67] Euler, H. V.; Hellstrom, H. *Ztschr. Phys. Chem.* **1932**, *15*, 342-346.
- [68] Cintă Pinzaru, S.; Müller, C.; Tomšić, S.; Venter, M. M.; Cozar, B. I.; Glamuzina, B. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*, 597-604.
- [69] Casella, M.; Lucotti, A.; Tommasini, M.; Bedoni, M.; Forvi, E.; Gramatica, F.; Zerbi, G. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *79*, 915-919.
- [70] Macernis, M.; Galzerano, D.; Sulskus, J.; Kish, E.; Kim, Y.-H.; Koo, S.; Valkunas, L.; Robert, B. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 56-66.
- [71] Yoshida, H.; Tasumi, M. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2803-2809.
- [72] D'Amico, K. L.; Manos, C.; Christensen, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1777-1782.
- [73] Simpson, J. H.; McLaughlin, L.; Smith, D. S.; Christensen, R. L. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 3360-3365.
- [74] Frederico, D.; Donate, P. M.; Constantino, M. G.; Bronze, E. S.; Sairre, M. I. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9126-9128.
- [75] Babudri, F.; Ciccimessere, A. R.; Farinola, G. M.; Fiandanese, V.; Marchese, G.; Musio, R.; Naso, F.; Sciacovelli, O. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3291-3298.
- [76] Nayler, P.; Whiting, M. C. *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1955**, 3037-3047.
- [77] Kuhn, R. *Angew. Chem.* **1937**, *50*, 703-708.
- [78] Batista, R. J. C.; Ordejón, P.; Chacham, H.; Artacho, E. *Phys. Rev.B* **2007**, *75*,.
- [79] Hsu, L. Y.; Xie, D.; Rabitz, H. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 124703.
- [80] Meisner, J. S.; Sedbrook, D. F.; Krikorian, M.; Chen, J.; Sattler, A.; Carnes, M. E.; Murray, C. B.; Steigerwald, M.; Nuckolls, C. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1007.
- [81] Meisner, J. S.; Ahn, S.; Aradhya, S. V.; Krikorian, M.; Parameswaran, R.; Steigerwald, M.; Venkataraman, L.; Nuckolls, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20440-5.
- [82] Langhammer, C.; Kasemo, B.; Zorić, I. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 194702.
- [83] Rang, M.; Jones, A. C.; Zhou, F.; Li, Z.-Y.; Wiley, B. J.; Xia, Y.; Raschke, M. B. *Nano. Lett.* **2008**, *8*, 3357-3363.
- [84] Shegai, T.; Miljković, V. D.; Bao, K.; Xu, H.; Nordlander, P.; Johansson, P.; Käll, M. *Nano. Lett.* **2011**, *11*, 706-711.

- [85] Shegai, T.; Li, Z.; Dadosh, T.; Zhang, Z.; Xu, H.; Haran, G. *P Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 16448-16453.
- [86] Adato, R.; Aksu, S.; Altug, H. *Mater. Today* **2015**, *18*, 436-446.
- [87] Lohmüller, T.; Iversen, L.; Schmidt, M.; Rhodes, C.; Tu, H. L.; Lin, W. C.; Groves, J. T. *Nano. Lett.* **2012**, *12*, 1717-1721.
- [88] Zhang, Y.; Walkenfort, B.; Yoon, J. H.; Schlücker, S.; Xie, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21120-21126.
- [89] Küstner, B.; Gellner, M.; Schütz, M.; Schöppler, F.; Marx, A.; Ströbel, P.; Adam, P.; Schmuck, C.; Schlücker, S. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1984-1987.
- [90] Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. *Phys. J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18849-18859.
- [91] Shanthil, M.; Thomas, R.; Swathi, R. S.; George Thomas, K. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1459-1464.
- [92] Salehi, M.; Steinigeweg, D.; Ströbel, P.; Marx, A.; Packeisen, J.; Schlücker, S. *J. Biophotonics* **2013**, *6*, 785-792.
- [93] Weldon, M. K.; Zhelyaskov, V. R.; Morris, M. D. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 265-269.
- [94] Sockalingum, G. D.; Beljebbar, A.; Morjani, H.; Angiboust, J. F.; Manfait, M. *Biospectroscopy* **1998**, *4*, S71-S78.
- [95] Benz, F.; Tserkezis, C.; Herrmann, L. O.; de Nijs, B.; Sanders, A.; Sigle, D. O.; Pukenas, L.; Evans, S. D.; Aizpurua, J.; Baumberg, J. J. *Nano. Lett.* **2015**, *15*, 669-74.
- [96] Kaminska, A.; Inya-Agha, O.; Forster, R. J.; Keyes, T. E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 4172-4180.
- [97] Damoiseaux, R.; Harris, J. "Methods for the preparation of rhodamine", 2005, US Patent 20050113584.
- [98] Haugland, R. P. Coupling of Monoclonal Antibodies with Fluorophores. In *Monoclonal Antibody Protocols*; Davis, W. C., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 1995.
- [99] Dolby, L. J.; Rosencrantz, D. R. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1888-1889.
- [100] Field, L.; Grunwald, F. A. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 946-953.
- [101] Mao, F.; Leung, W. "Xanthene dyes comprising a sulfonamide group", 2013, US Patent 8,436,170.
- [102] Shigeru, O.; Hideo, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3802-3812.
- [103] Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. in English* **1978**, *17*, 522-524.
- [104] Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- [105] Bensebaa, F.; Zhou, Y.; Brolo, A. G.; Irish, D. E.; Deslandes, Y.; Kruus, E.; Ellis, T. H. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**, *55*, 1229-1236.

- [106] Varnholt, B.; Oulevey, P.; Lubner, S.; Kumara, C.; Dass, A.; Bürgi, T. *Phys. J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 9604-9611.
- [107] Hildebrandt, P.; Stockburger, M. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5935-5944.
- [108] Martina, I.; Wiesinger, R. *e-PS* **2012**, 1-8.
- [109] Kristoffersen, A. S.; Erga, S. R.; Hamre, B.; Frette, y. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 1015-1024.
- [110] Magde, D.; Wong, R.; Seybold, P. G. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327-334.
- [111] König, M.; Radojicic, A.; Schlücker, S.; Xie, W. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *47*, 1024-1028.
- [112] Sarkar, J.; Chowdhury, J.; Pal, P.; Talapatra, G. B. *Vib. Spectrosc.* **2006**, *41*, 90-96.
- [113] Schütz, M.; Salehi, M.; Schlücker, S. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 2219-2224.
- [114] Mertens, J.; Eiden, A. L.; Sigle, D. O.; Huang, F.; Lombardo, A.; Sun, Z.; Sundaram, R. S.; Colli, A.; Tserkezis, C.; Aizpurua, J.; Milana, S.; Ferrari, A. C.; Baumberg, J. J. *Nano. Lett.* **2013**, *13*, 5033-8.
- [115] Wang, J.; Zhu, T.; Song, J.; Liu, Z. *Thin Solid Films* **1998**, 327–329, 591-594.
- [116] Wang, J.; Zhu, T.; Tang, M.; Cai, S. M.; Liu, Z. F. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1996**, *35*, L1381.
- [117] Michota, A.; Bukowska, J. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 21-25.
- [118] Tam, F.; Goodrich, G. P.; Johnson, B. R.; Halas, N. J. *Nano. Lett.* **2007**, *7*, 496-501.
- [119] Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
- [120] Kossoy, A.; Merk, V.; Simakov, D.; Leosson, K.; Kéna-Cohen, S.; Maier, S. A. *Adv. Opt. Mater.* **2015**, *3*, 71-77.
- [121] Jung, H. Y.; Park, Y.-K.; Park, S.; Kim, S. K. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *602*, 236-243.
- [122] Meng, X.; Baride, A.; Jiang, C. *Langmuir* **2016**, *32*, 6674-6681.
- [123] Branchadell, V.; Sodupe, M.; Ortuno, R. M.; Oliva, A.; Gomez-Pardo, D.; Guingant, A.; D'Angelo, J. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4135-4141.
- [124] Usta, H.; Tan, H. "Photocurable Polymeric Materials and Related Electronic Devices", 2013, US Patent 20130200345.
- [125] Ma, S.; Lu, X.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 709-713.
- [126] Cha, J. S.; Kwon, S. S. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5486-5487.
- [127] Farrington, G. K.; Kumar, A.; Wedler, F. C. *Org. Prep. Proc. Int.* **1989**, *21*, 390-392.
- [128] Wei, X.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3815-3818.
- [129] Wei, X.; Taylor, R. J. K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 616-620.
- [130] Klein, D.; Kiliçkiran, P.; Mlynek, C.; Hopf, H.; Dix, I.; Jones, P. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10507-10522.

- [131] Kuhn, R. *Angew. Chem.* **1937**, 50, 703-708.
- [132] Lozan, V.; Hunger, J.; Kersting, B. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, 360, 3189-3195.
- [133] Amans, D.; Bellosta, V.; Cossy, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5870-5874.
- [134] Madden, K. S.; Mosa, F. A.; Whiting, A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 7877-99.
- [135] Schaffer, H. E.; Chance, R. R.; Silbey, R. J.; Knoll, K.; Schrock, R. R. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 4161-4170.
- [136] Kupka, T.; Buczek, A.; Broda, M. A.; Stachów, M.; Tarnowski, P. *Journal of Molecular Modeling* **2016**, 22, 101.
- [137] Kriegisch, V.; Lambert, C. Self-assembled monolayers of chromophores on gold surfaces. In *Supramolecular Dye Chemistry*; Springer: Berlin Heidelberg, 2005.
- [138] Xiao, Y.; Liu, P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 9722-5.
- [139] Bates, C. G.; Saejueng, P.; Doherty, M. Q.; Venkataraman, D. *Org. Lett.* **2004**, 6, 5005-5008.
- [140] Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 1733-1738.
- [141] Boutagy, J.; Thomas, R. *Chem. Rev.* **1974**, 74, 87-99.
- [142] Ferrié, L.; Amans, D.; Reymond, S.; Bellosta, V.; Capdevielle, P.; Cossy, J. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 5456-5465.
- [143] Blout, E. R.; Fields, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 189-193.
- [144] Soullez, D.; Ple, G.; Duhamel, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1639-1646.
- [145] Frisch, M. J. *et al.* **2016**, Gaussian Inc. Wallingford CT.